



DESDE 1902
**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Genes *ompL1* e *lipL32* como marcadores de leptospiras
patogénicas – importância no diagnóstico da
leptospirose**

Márcia Filipa Dias Sousa

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

DEZEMBRO, 2019



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Genes *ompL1* e *lipL32* como marcadores de leptospirosas
patogénicas – importância no diagnóstico da
leptospirose**

Autor: Márcia Filipa Dias Sousa

Orientadora: Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Investigadora Auxiliar e Responsável do Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL), Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica (UMM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Coorientadora: Mestre Teresa Carreira, Técnica Superior do LLBL, da UMM do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

DEZEMBRO, 2019

Parte do trabalho da presente dissertação deu lugar a uma comunicação em forma de Poster que foi apresentado no Congresso de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec'19), que teve lugar nos dias 5 a 7 de dezembro' 2019, no Polo II da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade de Coimbra, Coimbra, sob o título:

“*ompL1* and *lipL32* genes as pathogenic *Leptospira* markers – relevance in leptospirosis diagnosis”

Márcia Sousa, Teresa Carreira, Maria Luísa Vieira

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa, sinto-me grata a toda as pessoas que de alguma forma me ajudaram a concretizar mais um objetivo de vida, sem elas isto não seria possível e por isso um “Muito Obrigada” do fundo do meu coração!

Primeiro, agradecer à Professora Doutora Maria Luísa Vieira, responsável pelo Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL) e Orientadora deste trabalho, pois sem ela nada disto teria sido possível, agradecer todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo destes meses, agradecer a paciência e toda a preocupação que sempre demonstrou com o nosso trabalho, sentido as nossas alegrias e as nossas tristezas, agradecer acima de tudo a orientação que levo para a vida e para um futuro nesta área e não só.

Um agradecimento também à Mestre Teresa Carreira, Técnica Superior do LLBL e coorientadora, por todo o apoio e ajuda no laboratório com todos os procedimentos, por toda a simpatia e carinho que sempre me transmitiu, pelo otimismo quando as coisas não corriam tão bem e pela sua boa disposição que era desde logo incentivo a bons resultados.

Um agradecimento aos colegas do laboratório, à Mestre Maria Fernandes, à Mestre Iara Gomes e ao Filipe Delgado, pois sempre que necessário disponibilizaram um pouco do seu tempo para me ajudar na realização dos trabalhos laboratoriais.

Um agradecimento às minhas colegas do Mestrado, Maria, Rute e Inês das quais nunca me esquecerei independentemente do que o futuro nos reserve, por animarem as horas de almoço, pela ajuda quando necessária, pelas conversas, pelos sorrisos, mas principalmente, pela amizade ao longo deste ano.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, Leonor e Fernando, pois, sem eles tudo isto não seria possível, estarei eternamente grata pela oportunidade que me proporcionaram! Sem esquecer a minha irmã, Vânia, e os meus sobrinhos, Roméo e Juliana, porque apesar de longe transmitem força e alegria para continuar atrás dos meus sonhos.

Um enorme agradecimento ao meu namorado, Francisco, por ter sido sempre um grande apoio e uma força para a concretização dos meus objetivos, pela paciência, por me demonstrar sempre o seu orgulho, por ter sempre uma palavra de incentivo e pela confiança, mas em especial, por todo o amor!

E por último, um agradecimento a duas grandes amigas, Ana e Jéssica, pela amizade, por ouvirem os meus desabafos, por me incentivarem a continuar e por estarem sempre ao meu lado quando necessário!

A todos, ***MUITO OBRIGADA***, pois sem vós nada disto seria possível!

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas do género *Leptospira* que afeta mais de um milhão de casos/ano. As leptospirosas são disseminadas no ambiente, sobretudo pela urina dos roedores, que são os principais reservatórios desta bactéria. Em Portugal, o Arquipélago dos Açores, constitui uma região endémica com uma elevada incidência anual, representando um problema de Saúde Pública.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: *i)* caracterizar a patogenicidade de culturas (isolados) de *Leptospira* spp., previamente obtidos de roedores capturados nas ilhas de São Miguel e Terceira (Açores), através de uma abordagem polifásica (ao nível fenotípico e molecular), esta última focada na deteção dos genes *ompL1* e *lipL32*; e *ii)* determinar o interesse destes genes no diagnóstico laboratorial da leptospirose.

Para tal, foram selecionadas (N=100) isolados de *Leptospira* spp., preservados a -80°C no IHMT. Fez-se novo cultivo em meio seletivo EMJH cujo crescimento foi acompanhado ao longo de, pelo menos, três meses. A caracterização da patogenicidade foi realizada através de testes de crescimento [a 13°C, e com a adição ao meio de cultura de 8-azaguanina (225µg/mL)], e um teste morfológico com adição de NaCl (1M). A identificação do sorogrupo/sorovar (sv.) de cada isolado foi realizada através de aglutinação microscópica, usando anticorpos monoclonais (mAbs). O estudo molecular de alguns isolados (n=32; 14 em cultura e DNA dos restantes), iniciou-se com a extração de DNA genómico, seguida de amplificação, usando dois protocolos de PCR convencional desenvolvidos e otimizados, no decurso do presente trabalho, utilizando *primers* com base nos genes *lipL32* e *ompL1*, presentes em espécies patogénicas de *Leptospira*. O protocolo baseado no gene *lipL32*, foi também utilizado em amostras de doentes (N=127), urina (n_u=99) e soro (n_s=28). Adicionalmente, quatro dos isolados de *Leptospira* e algumas amostras humanas (n_u=11 e n_s=5) foram testadas por *nested*-PCR, utilizado na rotina. O DNA amplificado de alguns isolados e amostras humanas foi sequenciado e analisado por BLAST.

Observou-se crescimento bacteriano em (n=14⁺/100) isolados cuja caracterização fenotípica revelou serem patogénicos. A avaliação com os mAbs permitiu incluí-los em dois sorogrupos distintos: Ballum (sv. Arborea) e Icterohaemorrhagiae (sv. Copenhageni). O protocolo “lipL32” revelou a presença de DNA leptospírico, no total dos isolados testados (n=32), enquanto que o protocolo “ompL1” detetou DNA específico em 84% (n=27⁺/32). Ambos os protocolos mostraram uma elevada especificidade, tendo o primeiro mostrado sensibilidade até 10⁰bact/mL. Os resultados da sequenciação confirmaram que todas as amostras analisadas (isolados murinos e humanas) eram espécies patogénicas de *Leptospira*.

Assim, os dados obtidos permitiram: *i)* conhecer a patogenicidade dos isolados estudados ao nível fenotípico e molecular; *ii)* corroborar a prevalência de leptospirosas dos sorogrupos Ballum e Icterohaemorrhagiae, sendo estes os que mais afetam a população Açoriana, o que é concordante com estudos anteriores para a mesma região e país; *iii)* confirmar que os sorogrupos Ballum e Icterohaemorrhagiae têm um forte tropismo para determinadas espécies de roedores, em particular para *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, respetivamente; *iv)* otimizar o protocolo de PCR com base no gene *lipL32*, tornando-o uma nova ferramenta muito útil quer em estudos epidemiológicos (nos roedores), quer em amostras clínicas, melhorando significativamente o atual diagnóstico molecular da leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose, diagnóstico, *ompL1*, *lipL32*.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by spirochetes of *Leptospira* genus, which affect more than one million people/year. Spirochetes are spread in the environment, mostly by the urine of rodents that are the main reservoirs of this bacterium. In Portugal, the Azorean Archipelago is an endemic region with a high annual incidence, representing a public health problem.

The aims of this work were: *i*) characterize the pathogenicity of *Leptospira* spp., cultures (isolates), previously obtained from rodents captured in São Miguel and Terceira islands (Azores), by polyphasic approach (at phenotypic and molecular level), this last, focused on detection of *ompL1* and *lipL32* genes; and *ii*) determine the interest of these genes in laboratory diagnosis of leptospirosis.

For this, isolates (N=100) of *Leptospira* spp., preserved at -80°C in the IHMT, were selected. Cultures were made on new EMJH selective culture medium, and its growth was followed over at least three months. The characterization of pathogenicity was performed by growth tests [at 13°C, and with addition of 8-azaguanine (225µ /mL) to the culture médium], and a morphological test, with NaCl (1M). The serogroup/serovar (sv) identification of each isolate was performed by microscopic agglutination, using monoclonal antibodies (mAbs). The molecular study of some isolates (n=32; 14 in culture and DNA of the others) began with the extraction of genomic DNA, followed by amplification, using two conventional PCR protocols developed and optimized during the present work, using primers targeting *lipL32* and *ompL1* genes, both present in pathogenic *Leptospira* species. The protocol based on the *lipL32* was also used in patient samples (N=127), urine (n_u= 99) and serum (n_s=28)]. Additionally, four of the *Leptospira* isolates and some human samples (n_u=11 and n_s=5) were tested by nested-PCR, used routinely. Amplified DNA from some isolates and human samples was sequenced and analyzed by BLAST.

Bacterial growth was observed in (n=14⁺/100) isolates whose phenotypic characterization was found to be pathogenic. Evaluation with mAbs allowed to include them into two distinct serogroups: Ballum (sv. Arborea) and Icterohaemorrhagiae (sv. Copenhageni). The “lipL32” protocol revealed the presence of leptospiral DNA in all isolates tested (n=32), while the “ompL1” protocol detected specific DNA in 84% (n=27⁺/32). Both protocols showed high specificity, and the first showed sensitivity up to 10⁰bact/mL. Sequencing results confirmed all samples analyzed (murine and human isolates) as pathogenic *Leptospira* species.

Thus, the obtained data allowed: *i*) to know the pathogenicity of the studied isolates at the phenotypic and molecular level; *ii*) confirm the prevalence of leptospires from Ballum and Icterohaemorrhagiae serogroups, which are the ones that most affect the Azorean population, which is in agreement with previous studies for the same region and country; *iii*) confirm that these serogroups have a strong tropism for determined rodent species particularly for *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*, respectively, and *iv*) optimize a new PCR protocol based on the *lipL32* gene, making it an useful tool either in epidemiological studies (in rodents) or in clinical samples, significantly improving the current molecular diagnosis of leptospirosis.

Key-words: Leptospirosis, diagnosis, *ompL1*, *lipL32*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	<i>Leptospira</i> : representação morfológica.....	4
Figura 1.2.	Fotografia de um tubo de cultura de <i>Leptospira</i> com o anel de <i>Dinger</i>	5
Figura 1.3.	Diagrama representativo do número de genes de <i>Leptospira biflexa</i> , <i>L. interrogans</i> e <i>L. borgpetersenii</i>	6
Figura 1.4.	Imagem esquemática da parede celular de <i>Leptospira</i> e a sua composição.	7
Figura 1.5.	Distribuição das diferentes OMP`s consoante a sua posição na membrana externa.....	7
Figura 1.6.	Representação esquemática das vias de transmissão das leptospiros, dos seus reservatórios e dos hospedeiros que infetam.....	10
Figura 1.7.	Exemplos de diferentes padrões de reatividade de aglutinação microscópica.....	17
Figura 1.8.	Exemplo de aglutinação da estirpe M20 (sv. Copenhageni) com anticorpos monoclonais.	17
Figura 2.1.	Imagem representativa de dois tubos de cultura EMJH com e sem crescimento bacteriano.....	23
Figura 2.2.	Imagem representativa da placa de titulação de fundo plano da TAM.	26

Figura 2.3.	Gráficos padronizados (estirpes, sorovares, sorogrupo).....	26
Figura 2.4.	Termociclador utilizado para as amplificações de DNA.	29
Figura 3.1.	Crescimento com sucesso de “novas” culturas de <i>Leptospira</i> spp.	34
Figura 3.2.	Representação gráfica dos resultados dos testes fenotípicos.....	35
Figura 3.3.	Representação gráfica dos títulos de aglutinação das estirpes de referência com os diferentes anticorpos monoclonais (sorogrupo Icterohaemorrhagiae).....	37
Figura 3.4.	Representação gráfica dos títulos de aglutinação das estirpes de referência com os diferentes anticorpos monoclonais utilizados (sorogrupo Ballum).....	38
Figura 3.5.	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR amplificados do <i>ompL1</i> (960 pb), em isolados de <i>Leptospira</i> spp.....	39
Figura 3.6.	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR amplificados tendo como alvo o gene <i>lipL32</i> , em isolados de <i>Leptospira</i> spp.....	40
Figura 3.7.	Resumo dos resultados obtidos pela abordagem fenotípica e molecular nos isolados de <i>Leptospira</i> spp. que integram o estudo.....	41
Figura 3.8.	Teste de sensibilidade e especificidade para o protocolo otimizado que utilizou <i>primers</i> com base no gene <i>ompL1</i>	42

Figura 3.9.	Teste de sensibilidade e especificidade para o protocolo otimizado que utilizou <i>primers</i> com base no gene <i>lipL32</i>	43
Figura 3.10.	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR amplificados para o alvo <i>lipL32</i> , em amostras humanas.....	44
Figura 3.11.	Esquema ilustrativo resumindo os resultados obtidos pelas diferentes abordagens moleculares realizadas nas amostras humanas (urina e soro).....	45
Figura 3.12.	Árvore filogenética construída com algumas das amostras em estudo.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.	Descrição das sequências oligonucleotídicas (<i>primers</i>) utilizados com base nos genes alvo (<i>ompL1</i> e <i>lipL32</i>) e a dimensão dos respetivos fragmentos amplificados.....	28
Tabela 2.2.	Descrição das condições de amplificação de DNA nos isolados em estudo, para os dois protocolos, tendo como alvos os genes descritos (<i>ompL1</i> e <i>lipL32</i>).....	29
Tabela 3.1.	Títulos de aglutinação obtidos, dos isolados em estudo, com os anticorpos monoclonais para o sorogrupo <i>Icterohaemorrhagiae</i>	36
Tabela 3.2.	Títulos de aglutinação obtidos, dos isolados em estudo, com os anticorpos monoclonais para o sorogrupo <i>Ballum</i>	37
Tabela 3.3.	Resultados obtidos após pesquisa no <i>BLASTn</i> , das sequências em estudo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS

% - Percentagem

μL - Microlitro

μg - Micrograma

μm - Micrometro

°C - Graus Celsius

Ac - Antigénio

Ag - Antigénio

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

C⁺ - Controlo Positivo

C⁻ - Controlo Negativo

CNPD - Comissão Nacional de Proteção de Dados

DDO - Doença de Declaração Obrigatória

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (= ácido desoxirribonucleico)

dNTP's - Desoxirribonucleótidos trifosfato

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (= Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

EMJH - Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

IgM - Imunoglobulina M

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

LCR - Líquido Céfalo-Raquidiano

LipL32 - Lipoproteína 32 (= major outer membrane protein of *Leptospira*)

lipL32 - Gene

LLBL - Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme

LPS - Lipopolissacáridos

M - Molar

mAbs - *Monoclonal antibodies* (= anticorpos monoclonais)

MACROLepto - Teste de Aglutinação Macroscópico em Lâmina

MEGA X - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X*

min. - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetro

Lista de Abreviaturas, Siglas ou Acrónimos

NaCl - Cloreto de Sódio

OMP - Proteínas da membrana externa

OmpL1 - *Outer membrane protein L1* (= proteína da membrana externa *L1*)

ompL1 - Gene

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de bases

PBS - *Phosphate buffered saline* (=Tampão fosfato salino)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (=reação da polimerase em cadeia)

pH - Potencial de Hidrogénio

RAA - Região Autónoma dos Açores

RNase - Ribonuclease

rpm - Rotações por minuto

seg. - Segundo

spp. - Espécies

sv. - Sorovar

s.l. - sensu lato

s.s. - sensu stricto

TAM - Técnica de Aglutinação Microscópica (Téc. Referência da OMS)

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	<i>ii</i>
RESUMO.....	<i>iv</i>
ABSTRACT.....	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE TABELAS.....	<i>ix</i>
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO.....	<i>1</i>
1.1. Leptospirose: definição e história	<i>2</i>
1.2. Taxonomia e Classificação do Género <i>Leptospira</i>	<i>3</i>
1.2.1. Classificação Antigénica	<i>3</i>
1.2.2. Classificação Genotípica	<i>4</i>
1.3. <i>Leptospira</i> : Caracterização morfológica e molecular	<i>4</i>
1.4. Epidemiologia.....	<i>8</i>
1.4.1. Reservatórios, Ciclo de Vida e Transmissão	<i>8</i>
1.4.2. Leptospirose no Mundo e em Portugal [continente <i>versus</i> Açores (área endémica)]	<i>10</i>
1.5. Manifestações clínicas, Diagnóstico e Terapêutica	<i>11</i>
1.6. O papel do Laboratório no apoio ao Diagnóstico	<i>13</i>
1.6.1. Testes Diretos	<i>13</i>
1.6.2. Testes Indiretos	<i>15</i>
1.7. Justificação do Tema da Dissertação	<i>19</i>
1.7.1. Objetivos.....	<i>20</i>

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Parte I – Isolados de <i>Leptospira</i> spp.	22
2.1. Pesquisa nas bases de dados do Laboratório (Projeto Açores).....	22
2.1.1. Seleção de amostras em cultura (isolados) e construção de nova base de dados	22
2.2. Relançamento e Manutenção das culturas	22
2.3. Identificação e Classificação Antigénica.....	24
2.3.1. Testes Fenotípicos	24
2.3.2. Testes com Anticorpos Monoclonais	25
2.4. Classificação Molecular.....	27
2.4.1. Extração de DNA genómico	27
2.4.2. Amplificação de DNA leptospírico (genes <i>ompL1</i> e <i>lipL32</i>)	27
PARTE II – Amostras Humanas.....	30
2.5. Pesquisa na soroteca do Laboratório (LLBL).....	30
2.5.1. Construção de bases de dados	31
2.6. Aplicação de Técnicas Moleculares ao Diagnóstico	31
2.6.1. Extração de DNA genómico (amostras de soro e urina)	31
2.6.2. Testes de Sensibilidade e Especificidade	31
2.6.3. Amplificação de DNA leptospírico (gene <i>lipL32</i>)	32
2.7. Sequenciação e análise de resultados	32
2.8. Tratamento de resultados	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Isolados de <i>Leptospira</i> spp.	34
3.1.1. Crescimento	34

3.1.2. Determinação do carácter patogénico vs intermédio ou saprófito dos isolados (“novas” culturas)	35
3.1.3. Identificação do sorogrupo e sorovar (isolados).....	36
3.1.4. DNA genómico extraído dos isolados.....	38
3.1.5. DNA leptospírico (genes <i>ompL1</i> e <i>lipL32</i>).....	39
3.2 Amostras Humanas	41
3.2.1. Teste de Sensibilidade e de Especificidade	41
3.2.2. DNA leptospírico com o gene <i>lipL32</i>	43
3.3. Sequenciação	45
3.4. Análise Filogenética	46
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	64
ANEXO 1 –BASE DE DADOS DOS ISOLADOS DE <i>Leptospira</i> spp.	65
ANEXO 2 - TESTES FENOTÍPICOS	66
ANEXO 3 – TESTES COM ANTICORPOS MONOCLONAIS	68
ANEXO 4 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO DOS ISOLADOS	70
ANEXO 5 – <i>Nested-PCR lipL32</i>	72
ANEXO 6 – BASE DE DADOS DAS AMOSTRAS HUMANAS	74
ANEXO 7 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO DAS AMOSTRAS HUMANAS	75

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leptospirose: definição e história

A leptospirose é a zoonose com maior distribuição mundial, causada por bactérias (espiroquetas) patogênicas do género *Leptospira*, e é considerada endémica em países de baixa renda e em regiões tropicais (Vedhagiri *et al.*, 2009; Dupouey *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2018). Estima-se que, anualmente, a leptospirose cause cerca de 58 mil mortes e mais de um milhão de casos benignos em todo o mundo (Costa *et al.*, 2015). Esta doença infecciosa bacteriana apresenta uma maior incidência na época das chuvas, pois o agente causal consegue sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente quando se reúnem as condições ideais, como por exemplo, um clima húmido e quente (Dupouey *et al.*, 2014).

As espiroquetas multiplicam-se nos seus “hospedeiros” reservatórios - pequenos roedores - e estes, excretam-nas depois para coleções de água doce, solos, superfícies, entre outros ambientes onde permanecem, podendo vir a infetar os humanos através de pequenas abrasões na pele ou pelas mucosas (Adler *et al.*, 2011) e até mesmo em pele sã. Para além de provocar doença nestes últimos, podem afetar também outros mamíferos, como animais domésticos e/ou de produção pecuária, causando enormes perdas económicas para esta indústria (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

O primeiro caso de leptospirose descrito em Portugal foi em Lisboa, em 1931. No mundo, umas décadas mais cedo, o médico alemão Adolph Weil descreveu em 1886 pela primeira vez a forma mais grave da doença, a qual é atualmente conhecida como síndrome de Weil e que é associada aos sorovares (sv.) Icterohaemorrhagiae e Copenhageni [*Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.)] conhecidos pela sua elevada patogenicidade, como reconhecido por diversos autores (Gonçalves, 2009; Trivedi e Kamath, 2010). Mas, se coube a Weil a descrição da doença, coube a dois médicos japoneses, Inada e Ido há mais de um século, em 1915, o isolamento pela primeira vez no Japão do agente causal da doença (Le Turnier e Epelboin, 2019). Foi depois Noguchi, em 1917, que propôs o nome de *Leptospira* depois de observar microscopicamente as extremidades em forma de gancho e as espiras muito finas que caracterizavam e caracterizam este agente bacteriano

o que lhe permite uma rotação sobre si próprio em espaço livre, bem como a penetração no organismo de potenciais hospedeiros acidentais. Foi ainda, no decurso da referida investigação, que Noguchi demonstrou a presença de leptospiros nos rins de ratos selvagens, fazendo assim a associação entre a bactéria e o seu reservatório, sendo que para este último, não ocorre um quadro de doença como ocorria para os humanos (Noguchi, 1917).

1.2. Taxonomia e Classificação do Género *Leptospira*

As leptospiros pertencem à Ordem Spirochaetales e à Família Leptospiraceae. Durante muitos anos, o género *Leptospira* foi dividido em dois grandes grupos, representando duas espécies distintas: *Leptospira interrogans*, espécie patogénica onde se incluem mais de 250 sorovares agrupados em cerca de 23 sorogrupos, e a espécie *L. biflexa* que representando todas as leptospiros saprófitas incluindo cerca de 60 sorovares agrupados em 38 sorogrupos. Esta classificação é designada por classificação convencional, fenotípica ou antigénica, já que tem por base a reatividade de determinados antígenos (proteínas e lipopolissacáridos) presentes na superfície da membrana externa dos diferentes sorovares. Geralmente nesta classificação os sorovares estão associados aos reservatórios e/ou a hospedeiros naturais das leptospiros (Mohammed *et al.*, 2011). No entanto, desde os primeiros anos deste século, coexiste com esta última, uma outra classificação, que é muito mais complexa e é designada de classificação genotípica ou molecular com base na hibridação DNA-DNA (ácido desoxirribonucleico) cuja homologia permite distinguir diferentes espécies dentro do Género *Leptospira*. (Levett, 2001, 2004; Mohammed *et al.*, 2011).

1.2.1. Classificação Antigénica

Como referido, apesar de já antiga, esta classificação perdura até aos dias de hoje, sendo utilizada, por exemplo, em contexto de diagnóstico laboratorial de rotina, já que é de grande utilidade na reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac), que é a base dos testes serológicos, incluindo o de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS) designado por Teste de Aglutinação Microscópica (TAM), que é o único que, por si só,

permite identificar o sorogrupo a que pertence o sorovar e/ou a estirpe infetante, o que é também de grande importância em estudos epidemiológicos.

1.2.2. Classificação Genotípica

Esta classificação, está estritamente ligada aos novos conhecimentos decorrentes da sequenciação do genoma completo de diversos sorovares. Conta atualmente com 22 espécies de *Leptospira*, sendo 10 patogénicas [ex: *L. interrogans* sensu stricto (s.s.), *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, entre outras]; sete intermédias (ex: *L. inadai*, *L. fainei*, ...) e cinco saprófitas (ex: *L. biflexa* s.s., *L. meyeri*, *L. wolbachii*, entre outras) (Turnier e Epelboin, 2019).

1.3. *Leptospira*: Caracterização morfológica e molecular

As leptospiros morfologicamente apresentam uma forma alongada e helicoidal conferida pelas espiras que possuem e exibem as extremidades em forma de gancho. Estas espiroquetas têm entre 0,1-0,3 μm de diâmetro e 6-20 μm de comprimento (**Fig. 1.1**). É no periplasma que se encontram as inserções dos dois flagelos os quais lhes permitem uma grande motilidade, tanto em meio líquido como em meio viscoso (Levett, 2001; Adler e Peña-Moctezuma, 2010). Devido à sua reduzida dimensão, a observação direta destas bactérias obriga à utilização de um microscópio ótico de fundo escuro ou de contraste de fase.

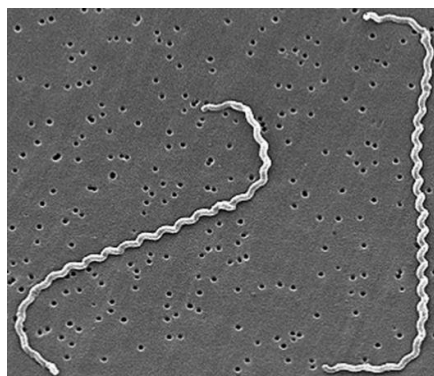


Figura 1.1. *Leptospira*: representação morfológica (em microscopia eletrónica) (adaptado de Levett, 2001).

Estas espiroquetas são bactérias gram-negativas e aeróbias obrigatórias e, *in vitro*, crescem e multiplicam-se a uma temperatura de 29 a 30°C, ao abrigo da luz e sob agitação permanente. O meio de cultura por excelência para o crescimento e/ou manutenção das leptospiros é o meio seletivo de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), contendo *Tween* 80 e albumina bovina.

O seu crescimento é lento e fastidioso, necessitando de, no mínimo, 10 a 14 dias. Em EMJH semissólido (com adição de 0,1% de agar) o crescimento bacteriano ótimo é conseguido quando se observa o anel de *Dinger* (**Fig.1.2**) que corresponde a uma tensão ótima do oxigénio (Levett, 2001).

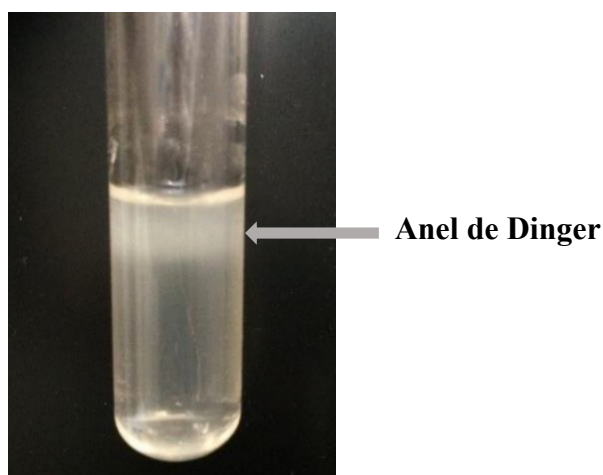


Figura 1.2. Fotografia de um tubo de cultura de *Leptospira* com o anel de Dinger (fotografia do autor).

O genoma de *Leptospira interrogans* (espécie patogénica) apresenta dois (2) cromossomas circulares (CI e CII), o primeiro, constituído por cerca de 4 milhões e meio de pares de bases e o segundo, com cerca de 350 mil pares de bases, o que no seu conjunto representa um tamanho cerca de três vezes superior aos outros dois Géneros (*Borrelia* e *Treponema*) de espiroquetas pertencentes à mesma Ordem. A espécie saprófita *L. biflexa*, por sua vez, apresenta um genoma relativamente menor (aproximadamente 4 milhões de pares de bases), também distribuído por dois cromossomas CI e CII, e ainda, por um replicação circular, o p74, que não se encontra nas espécies (spp.) patogénicas (Ren *et al.*, 2003; Picardeau *et al.*, 2008).

Mais recentemente, comparando o genoma das duas espécies anteriores com *L. borgpetersenii* (**Fig. 1.3**) foi observada uma diferença a nível do seu tamanho genómico, sendo que esta última em conjunto com a espécie saprófita apresentam um genoma reduzido relativamente à espécie *L. interrogans*, sendo que esta diferença se reflete na sobrevivência da bactéria nos diferentes meios. A espécie *L. interrogans* apresenta um genoma muito maior para conseguir sobreviver no hospedeiro e no meio aquático, enquanto que as restantes, apenas conseguem sobreviver ou em meio aquático (*L. biflexa*) ou no hospedeiro (*L. borgpetersenii*) (Adler e Peña-Moctezuma, 2010).

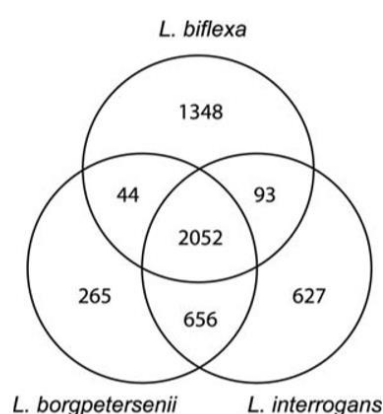


Figura 1.3. Diagrama representativo do número de genes que *L. biflexa*, *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* partilham entre si, e os genes únicos de cada espécie (adaptado de Adler e Peña-Moctezuma, 2010).

As espécies patogénicas são extracelulares, mas é a sua membrana externa enquanto barreira seletiva, que permite a entrada e saída de nutrientes e ao mesmo tempo que protege a bactéria contra substâncias tóxicas, é ainda, através da referida membrana que ocorrem as interações das espécies patogénicas com o(s) seu(s) hospedeiro(s). Na membrana externa (**Fig. 1.4**) encontram-se presentes diferentes tipos de proteínas (OMP) que representam alguns dos principais antígenos deste grupo de bactérias, tornando-as importantes alvos de estudo no sentido de encontrar novas metodologias de diagnóstico e até no desenvolvimento de vacinas. Alguns destes antígenos são lipopolissacáridos (LPS), lipoproteínas, proteínas transmembranas e proteínas periféricas, na (**Fig. 1.5**) encontram-se representadas algumas destas proteínas, consoante a sua posição na

membrana (Adler e Peña-Moctezuma, 2010; Raja e Natarajaseenivasan, 2015; Haake e Zückert, 2016).

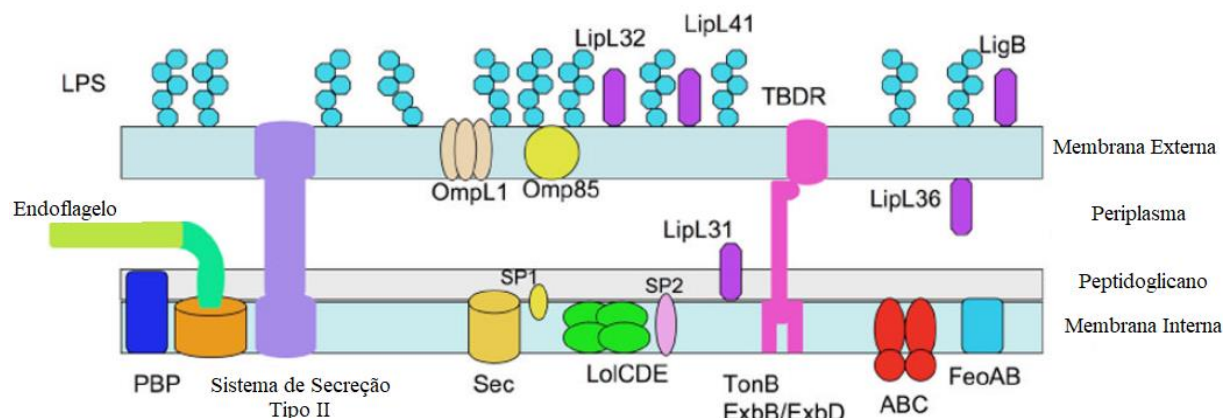


Figura 1.4. Imagem esquemática da parede celular de *Leptospira* e seus componentes. (adaptado de Ko *et al.*, 2009).

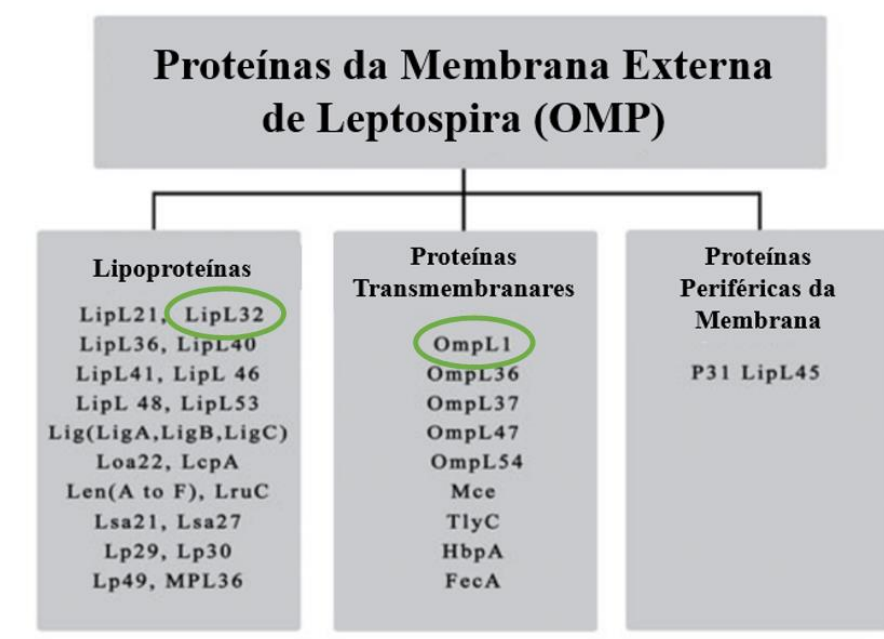


Figura 1.5. Distribuição das diferentes OMP consoante a sua posição na membrana externa. (adaptado de Raja e Natarajaseenivasan, 2015).

As proteínas transmembranares (**Fig. 1.5**) ou porinas são um grupo de OMP's essenciais para estas bactérias, pois é através dos canais presentes na membrana que adquirem a capacidade de nutrientes, bem como, de expulsar toxinas ou produtos de que

já não necessitam. As porinas constituem também excelentes antígenos de superfície que podem ser usados como alvo na resposta imune protetora. A primeira proteína transmembranar a ser descrita nas leptospiros patogénicas foi a porina OmpL1, com 31kDa, e o seu gene codificante, o gene *ompL1*, encontra-se altamente conservado nas leptospiros patogénicas, sendo característico destas e ausente nas espécies saprófitas. Esta porina tem diversas funções associadas, tais como, servirem de adesinas, de recetores para bacteriófagos, ativação das vias de transdução de sinal dos hospedeiros, induzir imunidade e também a alteração na expressão desta porinas é responsável pela resistência antimicrobiana (Raja e Natarajaseenivasan, 2015; Haake e Zückert, 2016).

Outra OMP de grande importância é a lipoproteína LipL32 e é também a mais abundante. Tal com a anterior apenas se encontra em leptospiros patogénicas, e o gene que codifica esta proteína é o *lipL32*, o qual se encontra igualmente altamente conservado nas referidas leptospiros, o que faz desta proteína também um excelente alvo para produção de vacinas ou até abordagens de diagnóstico. Esta lipoproteína encontra-se à superfície da membrana externa e uma das suas funções é servir de fonte de cálcio para a bactéria, sendo este, de extrema importância para a integridade da membrana. Trata-se, pois, de um dos antígenos mais reativos no soro dos doentes durante a infeção e os anticorpos anti-LipL32 podem ser detetados em todas as fases da doença (Vieira, 2006), sendo extremamente específicos não mostrando reatividade cruzada com outros antígenos, o que acaba por estimular a resposta inflamatória no seu hospedeiro. (Haake e Zückert, 2016; Zhylkibayev *et al.*, 2018).

1.4. Epidemiologia

1.4.1. Reservatórios, Ciclo de Vida e Transmissão

A leptospirose, como zoonose, ocorre nos humanos sempre de forma acidental através do contacto direto ou indireto com leptospiros, transmitidas pela urina ou tecidos dos principais reservatórios (roedores), ou ainda do contacto com outros animais infetados pelo referido agente patogénico. Estes reservatórios, essencialmente pequenos mamíferos, convivem em plena homeostasia durante toda a sua vida com a bactéria disseminando-a no ambiente natural. Existe também uma reconhecida associação entre

algumas espécies de roedores e alguns sorogrupos como é o caso dos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Ballum*, que estão associados a roedores dos géneros *Rattus* e *Mus*, respetivamente. No entanto, é ainda de referir que no contexto da transmissão, existem também os chamados hospedeiros de manutenção, para cujas espécies alguns sorovares têm um particular tropismo como são exemplo, o sorogrupo *Canicola*, associado a canídeos, enquanto que animais de produção pecuária, como bovinos e suínos, são particularmente afetados por leptospiros dos sorogrupos *Sejroe* e *Pomona* ou *Grippothyphosa*, respetivamente, entre outros exemplos. Também é conhecida a presença de leptospiros em muitas outras espécies de animais selvagens, como por exemplo, morcegos e até mesmo em marsupiais, contribuindo ainda mais para a dispersão das mesmas. Estas espiroquetas colonizam os túbulos renais dos animais reservatórios, onde se agregam e formam uma estrutura amorfa semelhante a um biofilme, acabando por ser excretadas através da urina no ambiente. As leptospiros excretadas conseguem permanecer viáveis por longos períodos de tempo em águas, solos, ambientes encharcados e nas carcaças de animais mortos, sem que haja alteração na sua capacidade de nova colonização ou infeção. Através do contacto com estes meios, os animais, tanto os domésticos como selvagens, os animais de produção pecuária, e também os humanos podem contrair a infeção (Bharti *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2009; Mayer-Scholl *et al.*, 2011).

Considera-se uma infeção por contacto direto quando estes agentes patogénicos provêm diretamente da carcaça de reservatórios, e indireto quando a infeção ocorre através da exposição a ambientes contaminados, como águas ou solos. Assim, algumas profissões, tais como: veterinários, trabalhadores de matadouros, caçadores, agricultores, operários da construção civil, trabalhadores de saneamento básico, entre outros, em especial aqueles que contactam diretamente com solos encharcados, como os trabalhadores dos campos de arroz são de potencial risco de contrair leptospirose. Mas também as atividades de lazer, como a canoagem a espeleologia e desportos de aventura e até a prática de golfe, são propícias à infeção pois os seus praticantes são expostos a meios potencialmente contaminados com leptospiros. Além disto, ainda existe um elevado risco em populações mais desfavorecidas que não possuem saneamento básico e

também aquando da ocorrência de inundações sazonais, em que ficam diretamente expostas a águas contaminadas (Haake e Levett, 2015).

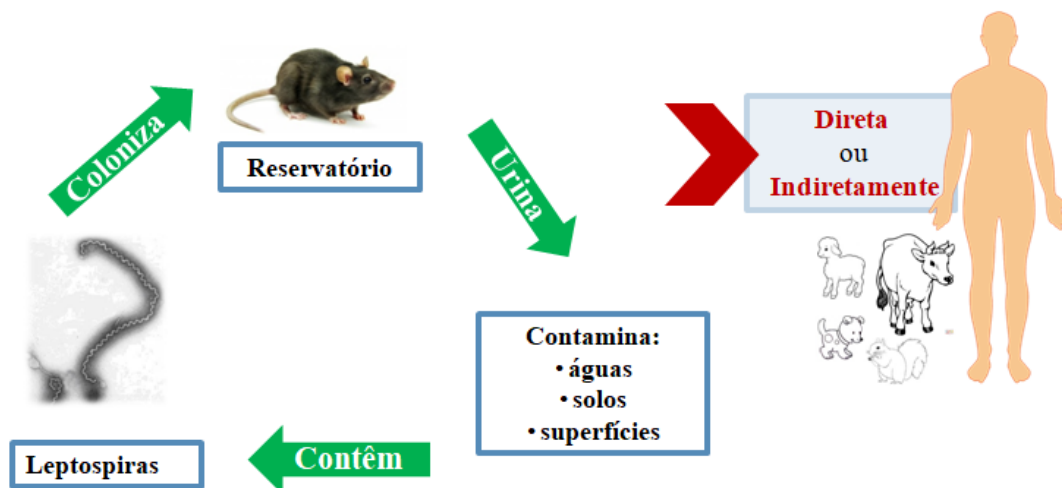


Figura 1.6. Representação esquemática das vias de transmissão das leptospirosas, dos seus reservatórios e dos hospedeiros que infetam (esquema original do autor).

1.4.2. Leptospirose no Mundo e em Portugal [continente *versus* Açores (área endémica)]

Globalmente, os últimos números conhecidos da leptospirose no mundo apontam para mais de um milhão de casos e cerca de 60 mil óbitos por ano (Costa *et al.*, 2015). Apesar de preocupantes, estes números encontram-se subestimados pois em muitos países especialmente os tropicais, os casos não são reportados ou são diagnosticados como outras doenças, dado que os sintomas e manifestações clínicas são, por vezes, totalmente sobreponíveis a outras infeções, as quais são, por sua vez, muito prevalentes nesses países (Le Turnier e Epelboin, 2019).

No que respeita ao nosso país, foi em Lisboa, em 1931, que se isolou pela primeira vez o agente causal da leptospirose (Figueira, 1931, citado por Collares-Pereira, 1989), e a partir de 1950 todos os casos da doença provocados pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* tornaram-se de notificação obrigatória, sendo que, após 1987, esta notificação passou a incluir todos os sorovares patogénicos de *Leptospira* pelo que a leptospirose é, desde então, uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO) (Vieira *et al.*, 2006).

Em Portugal continental, no entanto, os casos humanos são relativamente pouco frequentes quase sempre associados à ocorrência de pluviosidade. Assim, por exemplo sempre que ocorrem períodos de chuva intensa e/ou inundações, geralmente há lugar ao surgimento de casos (focos epidémicos) e/ou de surtos. Por outro lado, a Região Autónoma dos Açores (RAA) que é constituída por nove ilhas vulcânicas habitadas e localizadas a norte no Oceano Atlântico, entre o continente europeu e o continente americano, a situação da leptospirose tem sido nas últimas décadas muito preocupante, em parte, devido à sua localização atlântica que confere a esta Região insular um clima subtropical, onde ao longo do ano ocorrem temperaturas amenas, precipitação constante e níveis de humidade elevados. Estes fatores permitem que as referidas ilhas estejam muito cobertas por vegetação, providenciando assim uma elevada quantidade de nichos ecológicos para as diferentes espécies de micromamíferos (roedores) enquanto reservatórios de *Leptospira* (Witmer *et al.*, 2004). De facto, tem-se observado uma elevada incidência de leptospirose nos Açores que lhe confere o estatuto de área endémica com destaque para as duas maiores ilhas (São Miguel e Terceira), cuja densidade populacional é superior a 50% da totalidade do Arquipélago.

1.5. Manifestações clínicas, Diagnóstico e Terapêutica

A leptospirose pode ser assintomática ou sintomática. No segundo caso, desde o momento da infeção até ao aparecimento dos primeiros sintomas, ocorre a fase de incubação, que pode durar entre 5 a 14 dias, podendo em muitos casos durar entre 2 a 30 dias. A leptospirose sintomática, pode ser dividida em dois tipos: 1) a forma anictérica, que é caracterizada por uma sintomatologia que pode variar entre ligeiros desconfortos como febre baixa, dores de cabeça e cansaço generalizado, confundindo-se muitas vezes com outros quadros clínicos com os mesmo sintomas; e 2) a forma ictérica, que representa a forma mais severa da doença e que se caracteriza por uma falência multiorgânica, isto é, falência renal aguda, a falência também pulmonar e cardíaca, podendo terminar em morte quadro este, designado por síndrome de Weil. Esta segunda forma pode estar relacionada com um estado avançado da doença, ou tratar-se de um caso fulminante de leptospirose, geralmente associado a sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Levett, 2001; Haake e Levett, 2015; Le Turnier e Epelboin, 2019).

A doença pode ainda ser dividida em duas fases. Primeiro, ocorre a fase de leptospirémia, ou fase aguda, com uma duração de 3 a 10 dias, apresentando sintomas como dores de cabeça, febre, mialgias, entre outros. Esta fase é caracterizada pela presença de leptospiros no sangue e no líquido céfalo-raquidiano (LCR) e é também no final desta fase que começa a produção de anticorpos inespecíficos. Após o término desta fase começa então a fase imune, ou leptospirúria, onde deixam de existir os sintomas característicos da doença, podendo esta fase durar até 30 dias. Deixam também de existir leptospiros na circulação sanguínea que começaram a ser eliminadas por consequência da produção de anticorpos que com o tempo vão fazendo a seroconversão para anticorpos específicos anti-*Leptospira*. As leptospiros passam então a ser eliminadas pelo sistema urinário, podendo ser detetadas na urina do doente, por norma esta excreção é intermitente e pode durar várias semanas. A janela de tempo que ocorre entre a deteção das bactérias no sangue e a deteção de anticorpos é extremamente frágil, pois cada organismo reage de maneira diferente levando tempos diferentes, por isso, é muito importante que o laboratório tenha acesso a toda a informação clínico-epidemiológica quando se escolhe o método de diagnóstico a utilizar para evitar resultados falsos-negativos. Se se optar por uma pesquisa do agente no sangue do doente, é necessário que a mesma ocorra quando começam os primeiros sintomas, por outro lado, a TAM não demonstra uma grande sensibilidade nesta mesma fase, necessitando de mais tempo até à conversão dos anticorpos, no entanto, existe um problema que são os doentes de leptospirose fulminante que podem acabar por morrer antes que a seroconversão ocorra (Levett, 2001, 2004; Picardeau, 2013).

A leptospirose não confere imunidade a longo prazo, sendo esta apenas humoral, e este é um dos grandes problemas no desenvolvimento de novas vacinas. Existe, no entanto, uma exceção, quando se trata de populações de áreas endémicas. Estas estão continuamente sujeitas ao contacto com os antigénios circulantes, acabando por induzir o sistema imunitário a uma continua produção de anticorpos anti-*Leptospira* contra esses mesmos antigénios, conferindo-lhes dessa forma alguma imunidade, atenuando os sintomas ou mesmo não os revelando em caso de reinfeção (Esteves *et al.*, 2014).

1.6. O papel do Laboratório no apoio ao Diagnóstico

1.6.1. Testes Diretos

Os testes diretos são os que permitem a detecção direta do agente infeccioso ou do seu DNA. São exemplos destes testes, a observação microscópica em fundo escuro, a cultura em meio seletivo, visando o isolamento do agente e a detecção de DNA específico.

- **Observação microscópica em fundo escuro**

A microscopia de fundo escuro pode ser realizada em diferentes tipos de amostras biológicas (sangue, urina e LCR) permitindo detetar leptospiros, se presentes nas referidas amostras. No entanto, trata-se de um teste com uma baixa sensibilidade e também baixa especificidade, pois exige que estejam presentes cerca de 10^4 leptospiros/mL, dando origem muitas vezes a falsos-negativos devido à escassez de bactérias, as quais podem passar despercebidas, sobretudo se se tratar de um observador menos experiente, pelo contrário, pode originar falsos-positivos, pois a amostra pode contar outros artefactos que interfiram na observação, parecendo tratar-se dos agentes que se procuram. Em amostras de sangue, por exemplo, esta detecção apenas é recomendada durante a primeira semana de infeção, no entanto, no que respeita a amostras de urina, esta observação já pode ser muito útil, pois a segunda semana de infeção corresponde ao início da fase imune onde ocorre a eliminação das leptospiros pela urina (Levett, 2004; Ahmad *et al.*, 2005; Picardeau, 2013).

- **Cultura e Isolamento**

Para o isolamento de leptospiros a partir de amostras de sangue é necessário obter uma amostra assim que o doente relata os primeiros sintomas, enquanto que, as amostras de urina só devem ser inoculadas no meio de cultura quando correspondam à segunda e terceira semana de doença sintomática. Estas últimas necessitam de ser processadas praticamente de imediato depois de colhidas pois o tempo de sobrevivência da bactéria neste fluido é limitada.

Para se obter uma cultura, com sucesso, a partir de uma amostra biológica, esta é inoculada em meio EMJH semissólido, a uma temperatura de 29°C e sob agitação permanente. É necessário observar diariamente as culturas e semanalmente é

recomendado, caso não se observe a olho nu nenhuma modificação no meio, fazer uma observação (uma gota de cultura) em microscopia de fundo escuro. São geralmente necessárias, no mínimo, 6 a 8 semanas de incubação para se considerar uma cultura como negativa para o crescimento de leptospiros e para se poder descartar essa mesma cultura. Todo este tempo de incubação necessário torna o processo extremamente moroso, sobretudo em contexto do diagnóstico clínico o que na prática se traduz numa baixa sensibilidade, pelo que é um método que raramente ou nunca é utilizado para apoio ao diagnóstico (Bharti, 2003; Levett, 2004; Ahmad, 2005) mas que é de grande relevância no âmbito de estudos epidemiológicos ou em confirmação *post-mortem*.

- **Amplificação de DNA (PCR)**

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi criada e desenvolvida por Kary Mullis em 1986, o que lhe valeu o Prémio Nobel da Química em 1993, juntamente com Michael Smith (Madigan *et al.*, 2009).

A PCR permite criar cópias de forma exponencial de determinados segmentos de DNA *in vitro*, ou seja, consegue amplificar DNA de uma região do gene que se pretende, tornando-o depois detetável, após eletroforese em gel de agarose, e recorrendo a um transiluminador, sob luz violeta. É por isso, muito útil no diagnóstico clínico de várias doenças causadas por diversos agentes patogénicos (parasitas, bactérias, vírus, fungos), permitindo obter resultados em diferentes tipos de amostras humanas (sangue, urina, soro, LCR, entre outros) e também tem sido muito útil em estudos e investigação epidemiológica dado permitir igualmente amplificar DNA de amostras ambientais (solos, águas) bem como de órgãos e tecidos sólidos de micromamíferos (roedores) (Carreira, 2009; Madigan *et al.*, 2009) e diversas outras espécies animais.

No caso da leptospirose, esta técnica molecular revelou-se também de grande utilidade pois permite um diagnóstico laboratorial muito fidedigno, numa fase muito precoce da doença quando ainda não são detetáveis anticorpos específicos, algo que não é possível com os métodos de diagnóstico convencionais como a TAM, enquanto teste indireto e direcionado para a referida pesquisa. No entanto, apesar da PCR constituir uma mais valia no referido diagnóstico nos primeiros dias da doença, esta técnica não permite a identificação do sorovar infetante (Levett, 2001).

Para a execução da técnica são necessários diversos componentes: *i)* *primers* (*reverse* e *forward*), que consistem em oligonucleotídeos de DNA, sendo estes as sequências iniciadoras que se ligam à região do gene que se pretende amplificar (Carreira, 2009; Gonçalves, 2009); *ii)* DNA polimerase, enzima que faz a extensão dos *primers* usando o DNA que se pretende amplificar como molde (Mandiga *et al.*, 2009); *iii)* desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's: dATP's, dCTP's, dGTP's, dTTP's), são utilizados pela polimerase aquando da extensão; *iv)* tampão e iões (Mg^{2+}), vão estabilizar a reação e otimizá-la aumentando a interação entre os *primers* e a cadeia molde (Gonçalves, 2009) e, *v)* DNA alvo, que representa o DNA no qual queremos obter amplificação para provar a presença, ou não, daquela determinada região do gene.

No processo de amplificação de DNA estão envolvidas três etapas: desnaturação, emparelhamento e, por fim, a extensão. O primeiro passo, a desnaturação, traduz-se na quebra das pontes de hidrogénio que unem as duas cadeias e necessita de temperaturas entre os 90-97°C. A segunda etapa, o emparelhamento, vai permitir a ligação dos *primers* às cadeias complementares respetivas e necessita de uma temperatura mais baixa, sendo esta, apropriada para cada um dos diferentes *primers*. Por último, a extensão, que consiste na ligação da polimerase e na adição dos nucleótidos livres no final do sítio de ligação dos *primers*, a uma temperatura de cerca de 72°C. Todo este processo se repete ao longo de vários ciclos de modo a obter o máximo de cópias de DNA necessárias (Gonçalves, 2009; Joshi e Deshpande, 2010). No entanto, importa sempre ter em conta as adaptações que cada protocolo exige de acordo com o(s) gene(s) alvo e as respetivas sequências oligonucleotídicas (*primers*) a utilizar, assim como as próprias condições técnicas, incluindo o equipamento disponível em cada laboratório, em particular, o termociclador onde decorre a reação de amplificação.

1.6.2. Testes Indiretos

Não obstante, os métodos moleculares representaram uma grande revolução no que respeita ao apoio do laboratório ao diagnóstico de diversas doenças, incluindo a leptospirose, no entanto, continuam a ser os métodos indiretos os que mais são utilizados na rotina dos diversos laboratórios, pois em muitas regiões os primeiros ainda estão inacessíveis ou são extremamente dispendiosos.

Entre os muitos testes disponíveis e os que continuam a ser desenvolvidos, o Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) continua a ser o *gold standard* para o diagnóstico da leptospirose por ser o que mais informações fornece relativamente à evolução da doença com a consequente determinação do sorogrupo a que pertence a estirpe ou sorovar envolvido na infeção leptospírica (Carreira, 2009).

• Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)

Como referido, este teste é o único que consegue identificar presuntivamente o sorogrupo da estirpe infetante, com uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 95%, sendo por isso, considerado pela OMS o teste de Referência para o diagnóstico da leptospirose, e baseia-se numa reação antígeno-anticorpo da qual resulta aglutinação específica. Esta aglutinação ocorre entre o soro do doente, onde se encontram os anticorpos, e os antígenos vivos (em cultura) de leptospiros, que constituem no seu conjunto, a bateria universal de antígenos, disponível nos Laboratórios de Referência, como o LLBL, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). Esta bateria inclui, geralmente sorovares que representam entre 18 a 25 sorogrupos, aos quais ainda se juntam sorovares isolados localmente, para aumentar a sensibilidade do teste no país e/ou região onde é realizado. Atualmente, no LLBL, a bateria de antígenos vivos em utilização inclui 18 sorogrupos (17 representantes de *Leptospira interrogans* s.l. e um de *L. biflexa* s.l.).

A realização da técnica no início dos sintomas (primeiros 4 a 5 dias) como já referido tem uma baixa sensibilidade e pode gerar resultados erróneos por escassez temporal para a conversão completa de anticorpos anti-*Leptospira*, o que pode levar a reações cruzadas ou residuais com os diferentes antígenos, sendo por isso necessária uma nova amostra, obtida após uma a duas semanas, no mínimo pelo menos 10 dias (Levett, 2001; WHO/ILS, 2003; Gonçalves, 2009).

A leitura e interpretação dos resultados da TAM, requer pessoal muito treinado em microscopia de fundo escuro e bastante conhecedor das características morfológicas das leptospiros bem como dos diferentes padrões de aglutinação, decorrentes da reatividade de cada sorovar. Na (**Fig. 1.7**) exemplificam-se alguns padrões de reatividade da TAM e na (**Fig. 1.8**) uma imagem obtida pela autora desta Dissertação, onde se observa o padrão de reatividade da estirpe M20, na diluição de 1:80, no caso, com um dos anticorpos monoclonais do sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

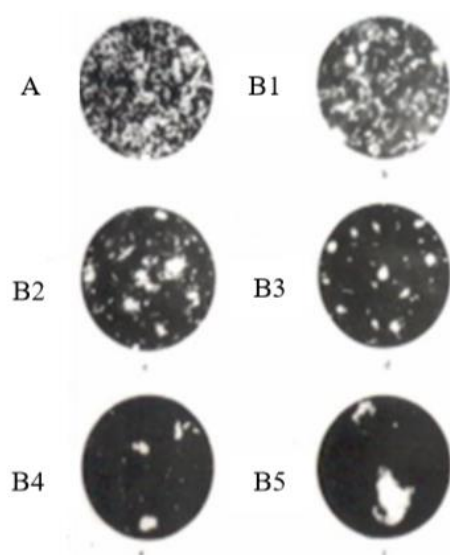


Figura 1.7. Exemplos de diferentes padrões de reatividade de aglutinação microscópica. A- Testemunha (antigénio total); B1= 75% leptospiras livres, B2= 50% livres, B3= 25% livres; B4 e B5= 0% livres, correspondendo a um resultado positivo (Gonçalves, 2009).

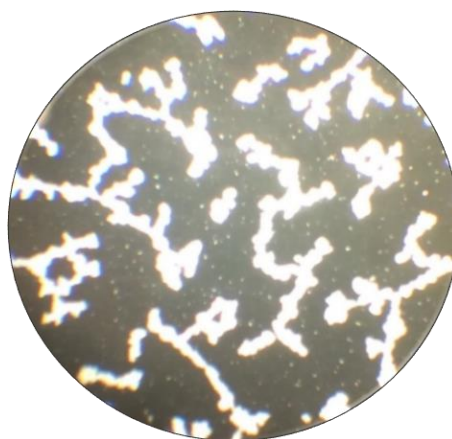


Figura 1.8. Exemplo de aglutinação da estirpe M20 com anticorpos monoclonais contra leptospiras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae/ sv. Copenhageni (Ampliação 100X) (fotografia do autor).

- **Outros testes indiretos**

Além da TAM, existem outros testes igualmente baseados na reação antígeno-anticorpo. Um deles, é o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para a detecção de anticorpos (imunoglobulinas) das classes M e G (IgM e IgG). Este teste serológico é muito utilizado em diversos laboratórios, especialmente hospitalares para o diagnóstico imunológico da leptospirose. Porém, a sua principal desvantagem é que apenas permite identificar a fase de infecção (recente ou tardia) de acordo com a detecção de anticorpos IgM e IgG, respetivamente, mas nada diz sobre o sorogrupo ou sorovar das leptospirosas responsáveis pela infecção (Haake e Levett, 2015).

Estão também disponíveis outros testes serológicos que são usados como testes de *screening* (rastreamento), cuja principal mais valia é a sua utilização em países ou regiões que não dispõem dos recursos humanos e/ou materiais necessários para a execução do referido diagnóstico laboratorial. São testes rápidos em suporte de papel ou em lâmina de vidro. É exemplo deste último, o Teste MacroLepto, teste de aglutinação macroscópica sobre lâmina, que foi desenvolvido e otimizado pelo LLBL há alguns anos, para utilizar como teste de rastreio nos Açores, permitindo uma primeira abordagem diagnóstica local, e antecipar em alguns dias o resultado definitivo dado posteriormente pelo LLBL (IHMT), contribuindo para a redução da mortalidade da população açoriana por leptospirose (Gonçalves, 2009; Garcia, 2011).

Atualmente, são várias as equipas que tentam criar um teste rápido de diagnóstico que possa ser utilizado nas várias regiões do mundo, no entanto, este processo muitas vezes é atrasado pelo facto dos diferentes testes serem específicos para determinados sorogrupos, geralmente os mais comuns mundialmente, deixando de fora alguns dos sorovares determinantes de cada região. Face a esta evidência, tem sido difícil a produção e utilização de um único teste em todas as regiões do planeta.

1.7. Justificação do Tema da Dissertação

Como já mencionado anteriormente, Costa e colaboradores em 2015 apontavam para cerca de um milhão de casos anualmente e quase 60 000 mortes em todos o mundo. Estes números, muito provavelmente encontram-se subestimados, pois muitos dos casos nem sempre são diagnosticados por falta de meios para tal, ou então, não se associa à leptospirose a causa da morte por esta ser muita vez confundida com outras patologias (WHO/ILS, 2003; Le Turnier e Epelboin, 2019). Perante estes factos, é necessário cada vez mais a criação de metodologias eficazes e de baixo custo. Além disto, é também necessário trabalhar no sentido de conhecer bem epidemiologicamente os sorovares/sorogrupos circulantes, assim como os respetivos reservatórios de modo a implementar medidas de prevenção e diagnóstico eficazes.

No caso de Portugal, ocorrem dois cenários distintos. Por um lado, temos a situação do continente que apresenta uma incidência média anual baixa, em contraste com o Arquipélago dos Açores, cuja incidência média anual é cerca de vinte vezes superior à do continente (Vieira *et al.*, 2006). Tendo isto em conta, é de extrema importância incrementar um conhecimento epidemiológico desta Região endémica para melhorar a intervenção local, quer ao nível clínico quer laboratorial, o que implica um melhor entendimento das leptospirosas circulantes no Arquipélago. Assim, é de extrema importância desenvolver metodologias, ou melhorar as já existentes, para o diagnóstico da doença.

Atualmente, para o diagnóstico molecular, em alguns laboratórios, incluindo o LLBL, recorre-se à amplificação de um segmento de DNA leptospírico do gene *lipL32*, usando um protocolo de *nested*-PCR, no entanto, este tipo de metodologia é dispendiosa, altamente propícia a contaminações, sobretudo devido à quantidade de manipulações necessárias, e também consomem muito tempo.

Assim, nesta Dissertação pretendeu-se tornar todo este processo de diagnóstico molecular menos moroso e mais acessível, com base numa avaliação de amostras humanas de doentes (urina e soro) ao nível molecular com os novos protocolos desenvolvidos e otimizados, como parte deste trabalho, a par de um conhecimento integrado polifásico dos isolados de *Leptospira* spp., ao nível molecular, fenotípico e

antigénico com protocolos já descritos, de modo a melhorar não só o diagnóstico laboratorial como consolidar o conhecimento epidemiológico já existente desta Região endémica, com benefícios concreto para a saúde da população insular e continental, considerando a preocupação que esta doença constitui em termos de Saúde Pública e global.

1.7.1. Objetivos

No sentido de responder ao desafio acima descrito, o presente trabalho teve assim os seguintes objetivos:

- Caracterizar ao nível fenotípico, antigénico e molecular isolados de *Leptospira* spp.;
- Identificar dois alvos genéticos (genes *ompL1* e *lipL32*) em isolados de *Leptospira* spp.;
- Otimizar protocolos de PCR com base nos genes alvo (*ompL1* e *lipL32*), para deteção de leptospiros patogénicas em amostras humanas;
- Determinar a capacidade diagnóstica dos referidos protocolos, como alternativa aos atuais em uso no(s) laboratório(s).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

Parte I – Isolados de *Leptospira* spp.

2.1. Pesquisa nas bases de dados do Laboratório (Projeto Açores)

Os isolados utilizados neste estudo foram selecionados de uma base de dados, previamente elaborada no âmbito de um anterior projeto (*Epidemiologia e Controlo da Leptospirose no Açores*) desenvolvido no LLBL (IHMT, UNL), numa parceria com o Governo Regional dos Açores e a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Dos cerca de 1600 isolados de *Leptospira* que constam nessa base, foi feita uma pesquisa exaustiva daqueles que não haviam sido caracterizados quer ao nível fenotípico quer molecular.

2.1.1. Seleção de amostras em cultura (isolados) e construção de nova base de dados

Selecionadas as amostras foi elaborada uma nova base de dados que serviu de apoio a este trabalho, com 100 isolados, onde se incluiu informação de algumas variáveis relativas aos reservatórios (roedores) e à sua proveniência (ex: ilha onde ocorreu a captura, espécie, sexo, idade, entre outras) (ANEXO 1).

2.2. Relançamento e Manutenção das culturas

Os isolados de *Leptospira* spp. analisados neste trabalho haviam sido previamente obtidos, através de cultura de tecido renal de diferentes espécimes de reservatórios silváticos (micromamíferos). Por sua vez, estes roedores foram capturados nas ilhas de São Miguel e Terceira (Açores) no âmbito do referido projeto de investigação de Leptospirose que decorreu nas referidas ilhas entre 2003-2009. Após a obtenção dos isolados, as respetivas culturas, na altura, foram armazenadas e preservadas em meio seletivo EMJH semissólido na sala de frio do IHMT, a -80°C. De modo a evitar grandes amplitudes térmicas, que poderiam agora inviabilizar o sucesso do relançamento dos diferentes isolados, estes, após terem sido retirados da arca a -80°C permaneceram algum tempo a -20°C, e depois ainda a 4°C. Só depois deste processo gradual de adaptação à

temperatura ambiente se prosseguiu para uma repicagem (passagem) de, aproximadamente, 20 gotas ($\pm 35 \mu\text{L}$ cada gota) de cada cultura para novo tubo de meio EMJH líquido. O meio foi enriquecido com soro de coelho para permitir uma melhor adaptação das bactérias e conseguir-se assim uma densidade ótima (10^8 bactérias/mL). As “novas” culturas foram mantidas numa incubadora orbital a 29°C , sob agitação permanente (80 rpm). Quando a densidade era atingida, sendo visível a olho nu pela turvação do meio como se pode observar na (**Fig. 2.1**), e comprovada depois por observação ao microscópio de fundo escuro, era feita uma inoculação (cerca de 20 gotas) para novo meio EMJH líquido, procedimento que foi sempre mantido até que cada cultura (isolado) ficasse livre de agar, isto é, não fossem observados microscopicamente no meio de cultura a presença de agar ou vestígios do mesmo.

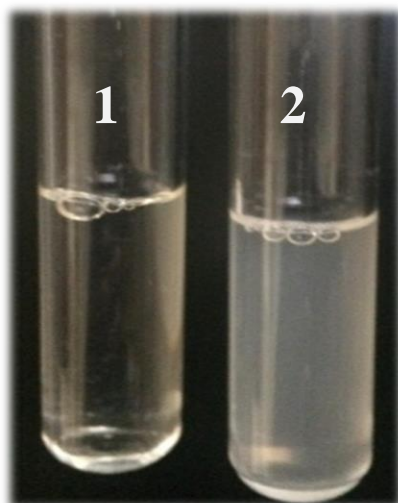


Figura 2.1. Imagem representativa de dois tubos de cultura EMJH. 1- Ausência de crescimento de cultura de *Leptospira*; 2- Presença de cultura de *Leptospira* (D.O. aproximadamente 10^8 bactérias/mL).

Quando as culturas atingiam o máximo de crescimento eram utilizadas para os diferentes testes, tanto fenotípicos como moleculares. Após realizados todos os testes fizeram-se culturas para armazenar os isolados para possível utilização futura (*stock*).

2.3. Identificação e Classificação Antigénica

2.3.1. Testes Fenotípicos

Apesar de serem semelhantes entre si, as leptospiros patogénicas diferem das espécies saprófitas em algumas características fenotípicas. Assim, é possível observar o diferente comportamento das espiroquetas na presença de determinadas condições que influenciam o seu crescimento e a sua morfologia.

Deste modo, no que respeita ao crescimento, foram utilizados dois testes fenotípicos: *i*) adição de 8-azaguanina com uma concentração de 225 µg/mL, ao meio de cultura (EMJH), de acordo com Johnson e Rogers (1964); e *ii*) colocação dos tubos de cultura à temperatura de incubação de 13° C. Relativamente à morfologia, foi utilizado um teste que consiste na adição de cloreto de sódio (NaCl) 1M, ao EMJH, como descrito em 1967, por Johnson e Harris.

Para se proceder a esta diferenciação dos isolados em estudo que apresentaram crescimento, sujeitaram-se os mesmos aos três testes fenotípicos descritos no parágrafo anterior, com as condições protocoladas no (ANEXO 2). Para a execução dos testes foi necessário submeter às mesmas condições dos isolados uma cultura de leptospiros patogénica conhecidas (sv. Copenhageni) e outra de leptospiros saprófitas (sv. Patoc) para servirem de controlos.

Há, no entanto, que referir que o teste de crescimento a uma temperatura de 13°C acabou por não ser realizado integralmente de acordo com o protocolo estabelecido para o efeito, dado não ter sido possível alocar uma estufa de incubação, à referida temperatura, durante o período de tempo que o teste exigia. Houve assim lugar a algum imprevisto de ordem técnica, tendo as culturas sido colocadas a crescer numa geleira onde se tentou criar e manter a temperatura pretendida, no entanto, sem um controlo automático da mesma, não foi possível manter uma temperatura estável, o que se admite poder influenciar os resultados deste teste.

Todos os testes exigiram culturas jovens (entre 4-10 dias) de cada isolado e com uma densidade ótima de 10⁸ bactérias/mL.

2.3.2. Testes com Anticorpos Monoclonais

Para a diferenciação fenotípica ao nível do sorogrupo são geralmente utilizados soros hiper-ímmes, produzidos a partir de coelhos imunizados com diferentes antígenos, obtidos a partir do Centro de Referência Europeu de Leptospirose (Amsterdão, Holanda), de elevada reatividade face aos diferentes sorogrupos. No caso deste estudo, sabia-se por estudos realizados anteriormente que nestas ilhas os isolados circulantes pertencem, na sua maioria, a dois sorogrupos prevalentes: Ballum e Icterohaemorrhagiae, assim, perante esta evidência, não se efetuou esta primeira abordagem com os isolados em estudo. Procedeu-se sim, à identificação ao nível do sorovar, que corresponde ao táxon base, e para tal, foram utilizados anticorpos monoclonais disponíveis no Laboratório, provenientes do mesmo Centro de Referência na Holanda. Assim para os sorovares do sorogrupo Ballum foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (mAbs): F74C7, F74C1 e F74C4; e F12C3, F52C1, F89C12, F70C24 para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae. A metodologia quer para a utilização de soros hiper-ímmes quer de anticorpos monoclonais, utiliza um procedimento análogo ao da TAM, embora de sentido inverso, já que na TAM, usam-se antígenos com sorogrupo e sorovar conhecidos e desconhece-se a presença (no soro a testar) de anticorpos contra cada um dos antígenos utilizados, enquanto desta vez, conhecem-se anticorpos e procura-se identificar os antígenos, isto é, identificar cada isolado, ao nível do sorovar/estirpe (**ANEXO 3**). A técnica, naturalmente, tem por base uma reação Ag-Ac da qual ocorre, ou não, uma aglutinação, neste caso, com os antígenos em estudo face aos anticorpos monoclonais de referência.

Depois da incubação, durante 2 horas a 37°C, as placas de titulação utilizadas na TAM (**Fig. 2.2**) são observadas e é feita a leitura dos títulos de aglutinação para os diferentes isolados, no microscópio de fundo escuro, sendo depois necessário efetuar comparações com gráficos padronizados para cada sorovar/sorogrupo, também estes gráficos disponibilizados pelo referido Centro de Referência Europeu, como documentado (**Fig. 2.3**), o que permite determinar a que sorovar/sorogrupo pertence cada isolado.

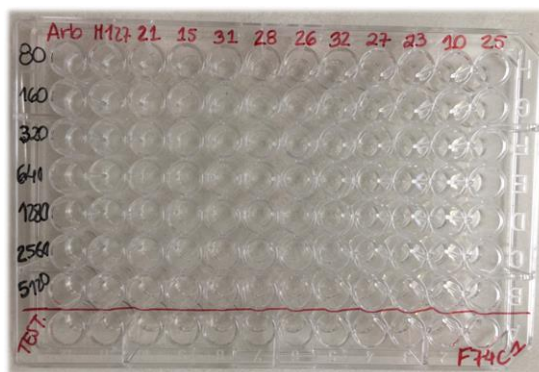


Figura 2.2. Imagem representativa da placa de titulação de fundo plano da TAM onde se realizaram os testes com mAbs de referência.

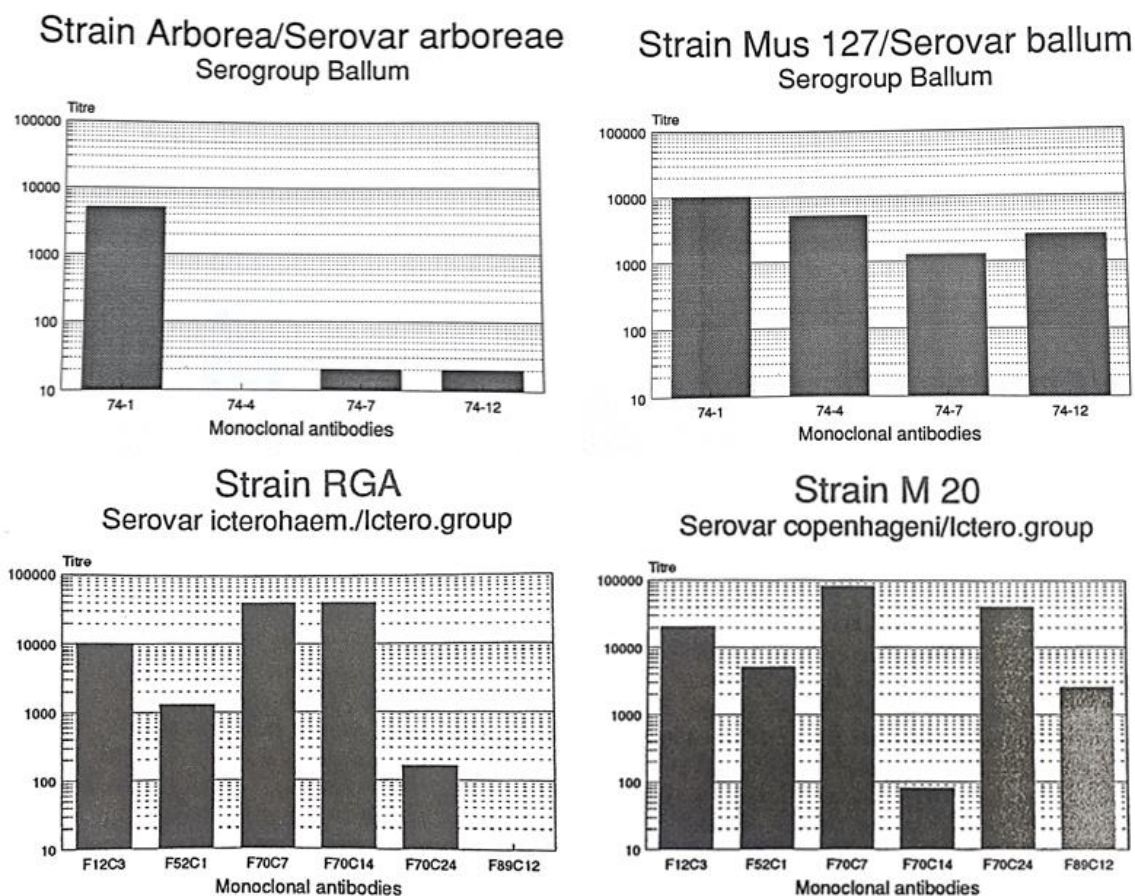


Figura 2.3. Gráficos padronizados referentes às estirpes/sorovares de dois sorogrupos em estudo: sorogrupo Ballum [estirpe/sv. Arborea/Arborea e Mus 127/Ballum]; e sorogrupo Icterohaemorrhagiae (estirpe/sv. RGA/Icterohaemorrhagiae e M20/Copenhageni), disponibilizados pelo Centro de Referência Europeu de Leptospirose (Holanda).

2.4. Classificação Molecular

2.4.1. Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico dos isolados foi utilizado um *kit* comercial, usado na rotina no laboratório (LLBL), o *kit* “*Citogene® Cell and Tissue - Purificação de DNA a partir de 3-5 milhões de células*”, comercializado pela Citomed – Equipamentos e Reagentes para Laboratório. Para os isolados que apresentaram um crescimento ótimo (n=14) o protocolo que acompanha o *kit* foi seguido sem alterações (ANEXO 4). No entanto, no caso dos isolados em que não se conseguiu o crescimento desejado (dado o menor número de repicagens, o que originou uma dificuldade técnica acrescida na eliminação do agar do meio de cultura, sendo que em alguns casos a mesma não foi completa), tendo sido necessário otimizar um protocolo de extração para se conseguir a eliminação deste composto de modo a obter-se um bom rendimento na extração de DNA. Assim, foi inserido um “novo” item descrito por Veloso *et al.* (2000), que levou a realizar três lavagens com uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) antes de iniciar o procedimento de extração conforme protocolado.

Realizou-se também a extração de DNA genômico de um outro grupo de isolados (n=18), com recurso ao protocolo de extração otimizado, a partir dos tubos-mãe onde as culturas se encontravam, os quais continham leptospiros numa maior densidade de bactérias/mL comparativamente às culturas que se encontravam a ser relançadas, proporcionando uma maior concentração de DNA e um maior rendimento.

2.4.2. Amplificação de DNA leptospírico (genes *ompL1* e *lipL32*)

Concluído o processo de extração, o DNA genômico extraído dos isolados (N=32) foi mantido a 4°C, até à sua utilização nas reações de PCR, utilizando *primers* específicos desenhados por Hernández-Rodríguez *et al.*, em 2014, para cada um dos genes alvo (*ompL1* e *lipL32*) para amplificação de DNA leptospírico dos diversos isolados em estudo.

Usaram-se dois protocolos, um previamente descrito por Hernández-Rodríguez *et al.* (2014) e por Mayer-Scholl *et al.* (2011) com *primers* baseados nos genes *ompL1* e *lipL32*, respetivamente (**Tabela 2.1**), com diversas modificações por nós introduzidas, de modo a conseguir-se otimizar, nas condições do laboratório e do material em estudo, um protocolo definitivo, como documentado na (**Tabela 2.2**). Estas amplificações dos segmentos de DNA pretendidos foram todas efetuadas no termociclador C100™ *Thermal Cycler* Bio Rad (**Fig. 2.4**).

Os produtos obtidos da amplificação pelos dois protocolos foram então separados através de eletroforese horizontal, em gel de agarose a 1,5%, a 125 volts e durante 50 minutos. Utilizou-se o corante *GreenSafe Premium™* e como marcador de DNA usou-se o *NZYDNA Ladder V* 100 pares de bases (pb) (100-1000 pb), ambos comercializados pela *Nzytech* para o protocolo que tinha como alvo o gene *lipL32*, enquanto que, para o outro protocolo com base no gene *ompL1* por amplificar um fragmento (amplicão) de maior dimensão (960 pb) recorreu-se ao marcador *EZ Load™ 100bp PCR Molecular Ruler* (100-3000 pb), manufaturado pela *Bio-Rad*. A observação dos géis foi sempre feita no equipamento de imagem existente no laboratório, o *Dolphin-DocGel Image System*, da *Wealtec®*.

Tabela 2.1. Descrição das sequências oligonucleotídicas (*primers*) utilizados com base nos genes alvo (*ompL1* e *lipL32*) e a dimensão dos respetivos fragmentos amplificados.

Gene	Primer	Sequência	Tamanho do Fragmento
<i>ompL1</i>	<i>ompL1</i> Foward	5- TTG ATT GAA TTC TTA GAG TTC GTG TTT ATA -3	960 pb
	<i>ompL1</i> Reverse	5- AAG GAG AAG CTT ATG ATC CGT AAC ATA AGT -3	
<i>lipL32</i>	<i>lipL32</i> Foward	5- CGT TGA AAT GGG AGT TCG TAT GAT T -3	423 pb
	<i>lipL32</i> Reverse	5- CCA ACA GAT GCA ACG AAA GAT CCT TT -3	

Tabela 2.2. Descrição das condições de amplificação de DNA nos isolados em estudo, para os dois protocolos, tendo como alvos os genes descritos (*ompL1* e *lipL32*).

Componentes a Mix	Protocolo (<i>ompL1</i>) (μL)			Protocolo (<i>lipL32</i>) (μL)		
H2O autoclavada	6			10		
Master Mix	13			10		
Primer Fw (10 μL)	1.5			1.5		
Primer Rv (10 μL)	1.5			1.5		
Template (molde)	3			2		
Total	25 μL			25 μL		
Fases da Amplificação	T °C	Duração	Ciclos	T °C	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	5 min.		94 °C	5 min.	
Desnaturação	94 °C	35 seg.		94 °C	30 seg.	
Emparelhamento	56 °C	35 seg.	40	55 °C	30 seg.	40
Extensão	72 °C	30 seg.		72 °C	30 seg.	
Extensão Final	72 °C	5 min.		72 °C	5 min.	



Figura 2.4. Termociclador C100™ Thermal Cycler Bio Rad® utilizado para as amplificações de DNA realizadas no trabalho laboratorial.

Para se poder comparar a eficácia e/ou a possível mais valia do protocolo proposto no presente trabalho e um outro, mais antigo, desenvolvido e otimizado para o mesmo alvo genético e utilizado comumente na rotina para o diagnóstico molecular da leptospirose em diversos laboratórios recorreu-se ainda, à amplificação de DNA leptospírico em quatro isolados de *Leptospira* spp., utilizando o referido procedimento, isto é, um protocolo de *nested-PCR* tendo também como alvo o gene *lipL32* mas amplificando uma região, muito conservada do mesmo, correspondente a 183 pb. Este protocolo é atualmente utilizado com as amostras humanas de utentes/doentes que dão entrada no laboratório de referência (LLBL), e utiliza dois pares de *primers* onde, o segundo par foi desenhado para amplificar uma região dentro da primeira região amplificada, aumento assim a sensibilidade da PCR, como descrito em 2006, por Jouglard e colaboradores. As condições necessárias à execução deste protocolo encontram-se descritas no (ANEXO 5).

PARTE II – Amostras Humanas

2.5. Pesquisa na soroteca do Laboratório (LLBL)

Para esta segunda parte do trabalho foi necessário recorrer aos registos do laboratório para fazer uma seleção aleatória das amostras de urina, utilizando também as amostras de soro do mesmo doente, caso existissem. Estas amostras encontravam-se guardadas no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL) do IHMT, UNL, de acordo com as diretivas da Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPd) a que o mesmo está vinculado, enquanto Laboratório de Referência para Leptospirose humana no país (Autorização nº55/2000). As amostras utilizadas integram um stock anonimizado e cuja utilização foi previamente autorizada por Consentimento Informado dos dadores, no âmbito de projetos anteriores de investigação de Leptospirose, sem limite temporal determinado, dos quais o presente trabalho é mais um desenvolvimento.

2.5.1. Construção de bases de dados

Foram selecionadas aleatoriamente 127 amostras ($n_{urina}=99$ e $n_{soro}=28$) para análise molecular, na perspectiva da sua melhoria, para utilização futura no diagnóstico da leptospirose, em alternativa às abordagens que vêm sendo utilizadas.

A estas amostras foi-lhes atribuída uma notação própria no âmbito deste estudo e foi elaborada uma base de dados propositadamente para este trabalho aonde constavam algumas informações anteriormente obtidas no laboratório, como por exemplo, os resultados da TAM; se haviam sido, ou não, observadas formas suspeitas de leptospiras em exame direto (microscopia de fundo escuro); e, por último, o resultado da amplificação de DNA, pela *nested*-PCR com os *primers* com base no gene *lipL32* ou com a PCR convencional com o gene *hap1*, como alvo (ANEXO 6).

2.6. Aplicação de Técnicas Moleculares ao Diagnóstico

2.6.1. Extração de DNA genómico (amostras de soro e urina)

A extração e purificação de DNA genómico das amostras humanas ($n_{urina}=99$ e $n_{soro}=28$) foi efetuada de acordo com o protocolo descrito no *kit* comercial “*Citogene®Cell and Tissue – Purificação de DNA a partir de 1mL de fluídos corporais*” (Citomed) adotado pelo LLBL (alterações - ANEXO 7).

2.6.2. Testes de Sensibilidade e Especificidade

Previamente à realização das reações de PCR para amplificação de DNA genómico das amostras em estudo, realizaram-se ensaios para avaliar a sensibilidade e especificidade dos novos protocolos de PCR para os *primers* em estudo. Assim, para o teste de sensibilidade prepararam-se diluições seriadas de base 10 a partir de culturas *in vitro* de sorovares de *Leptospira* spp. (10^8 bactérias/mL a 1 bactéria/mL). Para o teste de especificidade, para além de DNA de leptospiras patogénicas (sv. Ballum) foi utilizado DNA de leptospiras saprófitas (*L. biflexa*), e ainda, de outras espiroquetas dos Géneros *Borrelia* e *Treponema*, respetivamente, *B. garinii* e *T. pallidum*. Para ambos os ensaios, utilizou-se um controlo negativo substituindo a amostra de DNA pela mesma quantidade de água esterilizada.

2.6.3. Amplificação de DNA leptospírico (gene *lipL32*)

O protocolo de amplificação de DNA nas amostras humanas [N=127 ($n_{urina}=99$ e $n_{soro}=28$)] foi o mesmo otimizado e utilizado nos isolados (**Parte I, ponto 2.4.2**). Foi ainda, utilizado o protocolo de *nested*-PCR tendo como alvo o gene *lipL32* (outra região), descrito no mesmo ponto, para 11 amostras de urina e cinco amostras de soro.

2.7. Sequenciação e análise de resultados

Para confirmar a concordância dos resultados obtidos pelos diversos testes realizados (fenotípicos e moleculares) enviaram-se para sequenciação (*Eurofins Genomics*, Alemanha) os produtos [DNA leptospírico sob o gene *lipL32* (423 pb)] de algumas das amostras, tanto de isolados como humanas.

Para a análise das sequências obtidas, primeiro utilizou-se o *BioEdit*, um programa que nos permite analisar o cromatograma obtido da sequenciação e quando necessário editar essas mesmas sequências. Com a sequência já editada submeteu-se a mesma a uma ferramenta *online* [*Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)], que permite pesquisar a partir de uma base de dados sequências ou regiões similares à sequência desconhecida, utilizando a plataforma para nucleótidos (*Nucleotide BLAST*), permitindo assim a atribuição de uma identidade genoespecífica às amostras em estudo.

A partir do MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) fez-se a análise filogenética das amostras em estudo. Para esta análise foram utilizadas ($n=15$) sequências em estudo, bem como também, algumas sequências depositadas no *GenBank* para as quais as amostras problema mostraram uma maior semelhança.

2.8. Tratamento de resultados

Os dados obtidos neste trabalho foram inseridos e analisados nas bases de dados *Excel* e *Access* (Microsoft® Office, versão 2019). Parte da apresentação dos mesmos na presente Dissertação foi feita através de gráficos e tabelas. Caso se justifique, será feita análise e inferência estatística.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Isolados de *Leptospira* spp.

3.1.1. Crescimento

As culturas originais foram mantidas em condições ótimas *in vitro*, e fizeram-se repicagens a cada dois meses das culturas que não apresentavam crescimento visível a olho nu, tendo (n=14⁺/100) dos isolados evidenciado crescimento considerado “muito bom”, como mostra a (Fig. 3.1).

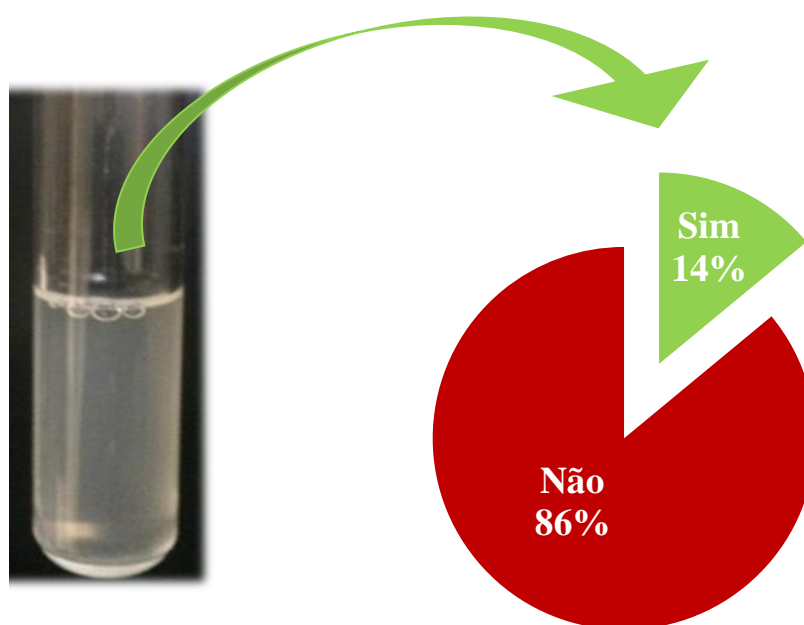


Figura 3.1. Crescimento com sucesso de “novas” culturas de *Leptospira* spp., em meio seletivo EMJH líquido, e representação gráfica da percentagem de isolados obtidos (n= 14).

3.1.2. Determinação do carácter patogénico vs intermédio ou saprófito dos isolados (“novas” culturas)

A caracterização fenotípica (como descrito em 2.3.2) foi efetuada nos isolados que apresentavam um crescimento com uma densidade ótima, isto é, em (n=14) isolados. Todos os testes fenotípicos foram acompanhados por um grupo controlo onde foi incluída uma estirpe saprófita (sv. Patoc), representante de *Leptospira biflexa*, e uma patogénica (sv. Copenhageni), representante de *L. interrogans*, as quais serviram para comparação do crescimento e da morfologia das leptospiros (isolados) correspondentes a cada uma das “novas” culturas. Os resultados obtidos em cada um dos testes está representado na (Fig. 3.2).

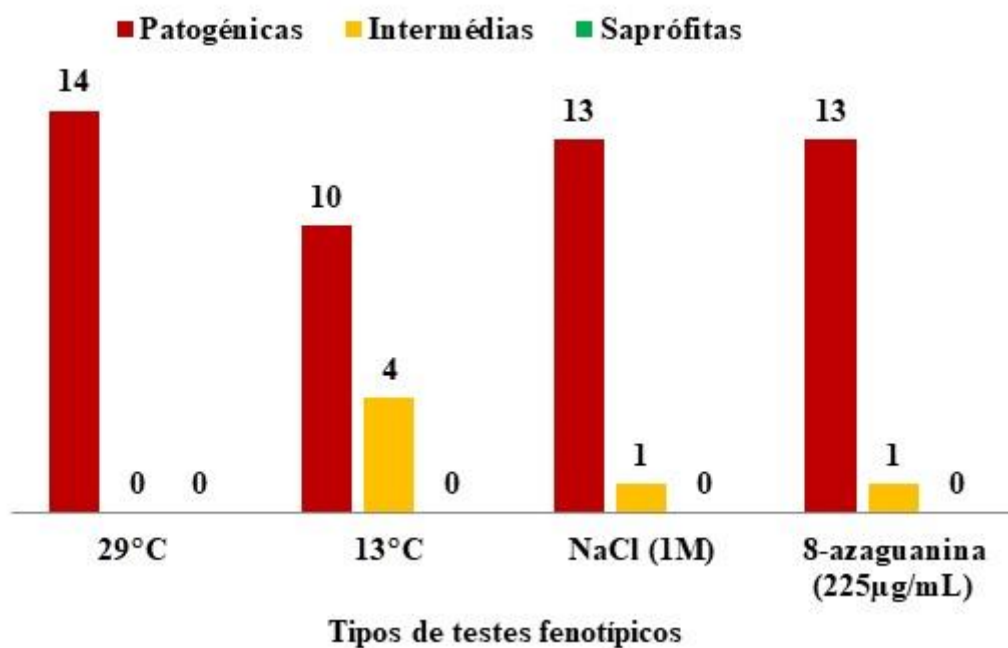


Figura 3.2. Representação gráfica do número de isolados que mostrou carácter patogénico e/ou intermédio nos diferentes testes fenotípicos de crescimento (29° e 13°C e com adição de 8-azaguanina), e de morfologia (adição de NaCl).

3.1.3. Identificação do sorogrupo e sorovar (isolados)

A identificação dos isolados ao nível do sorovar foi feita por comparação do padrão gráfico dos títulos das duas estirpes de referência com os títulos de aglutinação obtidos com os mAbs para cada isolado.

- **Sorogrupo Icterohaemorrhagiae**

Documentam-se na (**Tabela 3.1**), os resultados obtidos em 13 isolados estudados para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, e mostra-se, a título de exemplo, a identificação do isolado nº31 (Pu641) que foi incluído no referido sorogrupo correspondente ao sorovar Copenhageni.

Tabela 3.1. Títulos de aglutinação obtidos, dos isolados em estudo, com os anticorpos monoclonais (F12C3, F89C12, F70C24) para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, incluindo duas estirpes de referência (RGA e M20) do referido sorogrupo.

Isolados	Títulos de Aglutinação			Estirpe	Sorovar
	F12C3	F89C12	F70C24		
RGA	1/2560	-	-		
M20	1/5120	1/640	1/1280		
21 (Pu636)	1/2560	1/320	1/1280	M20	Copenhageni
15 (Pu643)	1/5120	1/320	1/5120	M20	Copenhageni
31 (Pu641)	1/5120	1/320	1/5120	M20	Copenhageni
28 (Pu585)	1/5120	1/160	1/2560	M20	Copenhageni
26 (Pu580)	1/5120	1/320	1/2560	M20	Copenhageni
32 (Pu635)	1/5120	1/320	1/2560	M20	Copenhageni
27 (Pu577)	1/5120	1/640	1/5120	M20	Copenhageni
23 (Pu586)	1/5120	1/640	1/2560	M20	Copenhageni
25 (Pu581)	1/5120	1/640	1/2560	M20	Copenhageni
40 (Pu645)	1/5120	NFT	NFT	M20	Copenhageni
24 (Pu639)	1/5120	NFT	1/5120	M20	Copenhageni
43 (Pu568)	1/5120	NFT	NFT	M20	Copenhageni
38 (Pu419)	1/5120	NFT	1/5120	M20	Copenhageni

NFT= Não foi testado por exiguidade de volume.

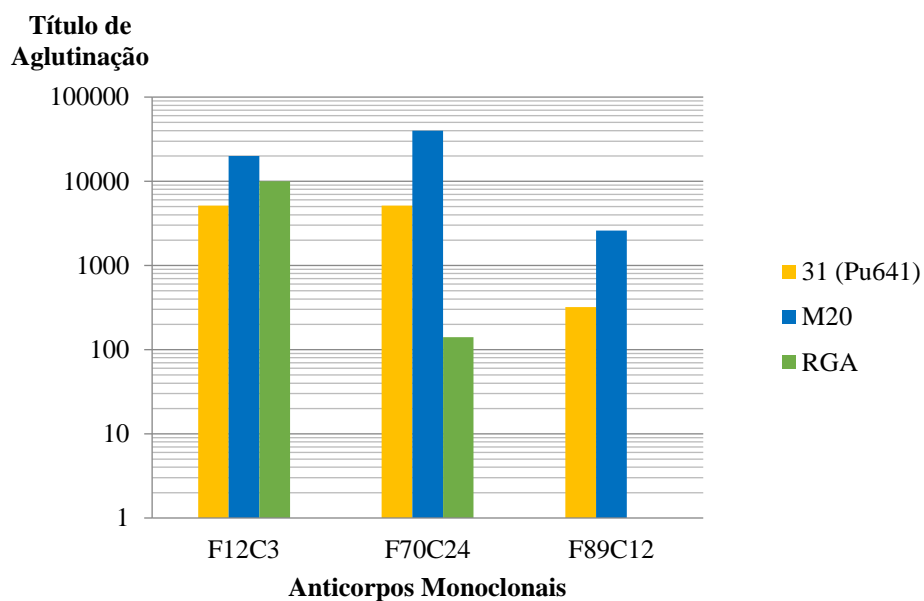


Figura 3.3. Representação gráfica dos títulos de aglutinação das estirpes de referência com os três diferentes anticorpos monoclonais utilizados (sorogrupo Icterohaemorrhagiae), consoante os valores padronizados pelo Centro de Referência Europeu, comparativamente com um dos isolados em estudo (nº31, Pu641) identificado como pertencente ao referido sorogrupo.

• Sorogrupo Ballum

No que respeita ao sorogrupo Ballum, a (Tabela 3.2), mostra o resultado obtido com um dos isolados em estudo e a (Fig. 3.4) representa a identificação do isolado [nº10 (H128)] face à reatividade evidenciada pela estirpe e sorovar de referência para o sorogrupo em apreço.

Tabela 3.2. Títulos de aglutinação obtidos, dos isolados em estudo, com os anticorpos monoclonais (F74C7, F74C1, F74C4) para o sorogrupo Ballum, incluindo duas estirpes de referência (Mus 127 e Arborea) do referido sorogrupo.

Isolado	Títulos de Aglutinação			Estirpe	Serovar
	F74C7	F74C1	F74C4		
Arborea	1/160	1/1280	-		
Mus 127	1/640	1/640	-		
10 (H128)	1/80	1/320	-	Arborea	Arborea

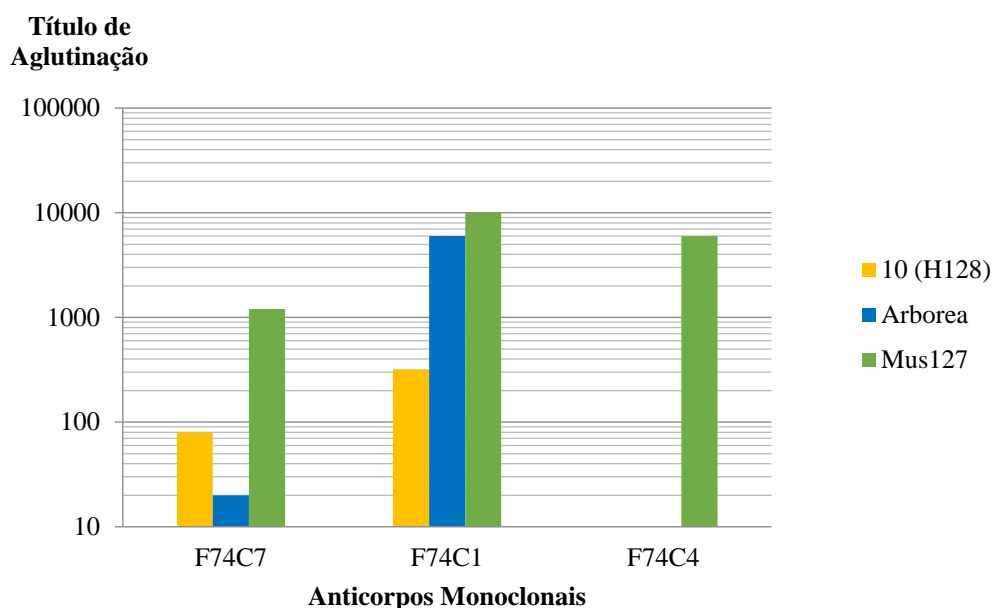


Figura 3.4. Representação gráfica dos títulos de aglutinação das estirpes de referência com os três diferentes anticorpos monoclonais utilizados (sorogrupos Ballum), consoante os valores padronizados pelo Centro de Referência Europeu, comparativamente com um dos isolados em estudo (nº10, H128) identificado como pertencente ao referido sorogrupo.

3.1.4. DNA genómico extraído dos isolados

Relativamente aos isolados, do total de culturas (N=100), foi possível obter DNA genómico “molde” de (n=32), sendo que em 14 das mesmas, os resultados foram os expectáveis, de acordo com os procedimentos descritos na secção ‘Material e Métodos’ da presente Dissertação. Verificou-se que as respectivas culturas mostraram um crescimento ótimo, com valores de densidade ótica (DO) considerados bons. No entanto, em (n=18) isolados apesar de, nas mesmas condições, o crescimento foi difícil, e numa primeira fase, as referidas culturas mostraram uma baixa concentração de espiroquetas, pelo que se optou por fazer uma otimização do protocolo para aqueles isolados em concreto, a qual foi bem sucedida e permitiu a obtenção de DNA nas condições necessárias.

3.1.5. DNA leptospírico (genes *ompL1* e *lipL32*)

- **Gene *ompL1***

A amplificação de DNA com o novo protocolo otimizado usando os *primers* que têm como alvo o gene *ompL1*, um dos genes que se encontram exclusivamente em leptospiiras patogénicas, permitiu identificar alguns dos isolados. Assim, do total de isolados para os quais se testou este protocolo, obteve-se DNA leptospírico em (27⁺/32; 84,4%) dos quais 22 apresentavam uma banda (amplicão) bastante forte e os restantes um amplicão ténue, como documentado na (Fig.3.5). Por sua vez, em cinco (15,6%) dos referidos isolados não se verificou amplificação de DNA leptospírico.

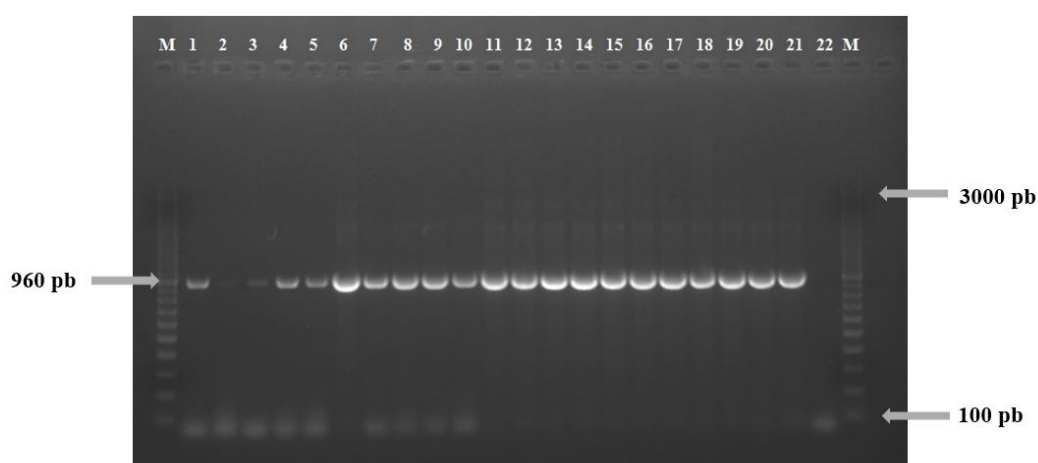


Figura 3.5. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR amplificados do *ompL1* (960 pb), em isolados de *Leptospira* spp.. M - marcador molecular de 100 pb; 1-20 - isolados de *Leptospira* spp.; 21- C⁺ - controlo positivo (estirpe M20, sorovar Copenhageni, sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 22 - C⁻ - controlo negativo da PCR.

- **Gene *lipL32***

O outro protocolo otimizado neste estudo, que amplifica uma região de 423 pb do gene *lipL32*, também exclusivo de espécies patogénicas de *Leptospira*, a amplificação de DNA leptospírico foi total (32⁺/32; 100%), tendo-se verificado que todos os produtos amplificados apresentaram uma banda muito forte (Fig. 3.6.).

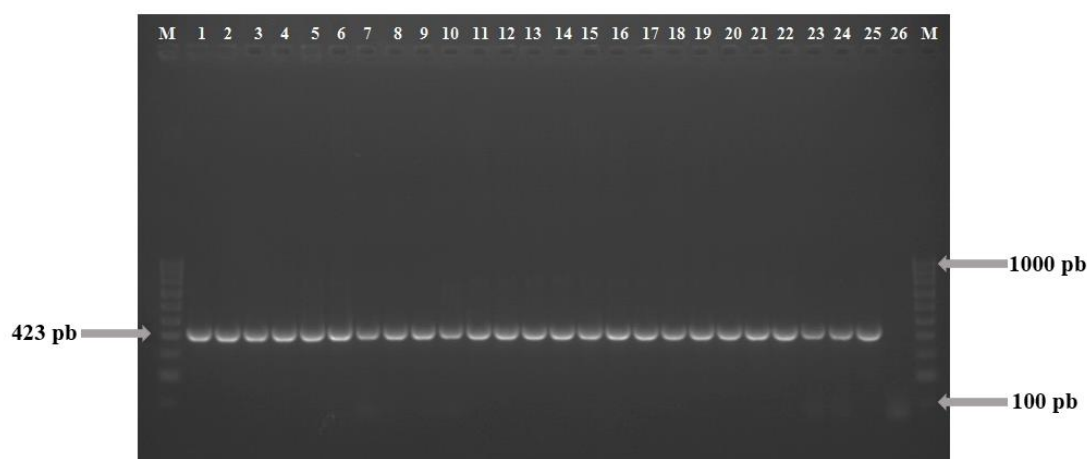


Figura 3.6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR amplificados tendo como alvo o gene *lipL32* (423 pb), em isolados de *Leptospira* spp.. M- marcador molecular (100 pb); 1-24 - isolados de *Leptospira* spp.; 25 - C⁺ (estirpe M20, sorovar Copenhageni, sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 26 - C⁻ da PCR.

No esquema representado na (**Fig. 3.7**) faz-se um resumo dos principais resultados obtidos a partir dos isolados, na abordagem fenotípica (com a aplicação de testes de crescimento a uma temperatura (13°C) e com adição ao meio de cultura (EMJH) de 8-azaguanina, condições estas, que não são as ideais para o crescimento de leptospiros patogénicas, permitindo evidenciar o carácter patogénico de (n=10/14; 71,4%) e (n=13/14; 93%) respetivamente, dos referidos isolados. O mesmo, acontecendo para o teste de alteração morfológica que, pela adição de cloreto de sódio, permitiu igualmente distinguir leptospiros patogénicas em 93% dos isolados face à morfologia observada. Por sua vez, também a utilização dos anticorpos monoclonais permitiu a obtenção de resultados quanto à identificação do sorovar de cada isolado.

No que respeita à abordagem molecular, os resultados mostraram a deteção em 100% e 83% do total de isolados estudados (n=32) para o gene *lipL32* e *ompL1*, respetivamente.

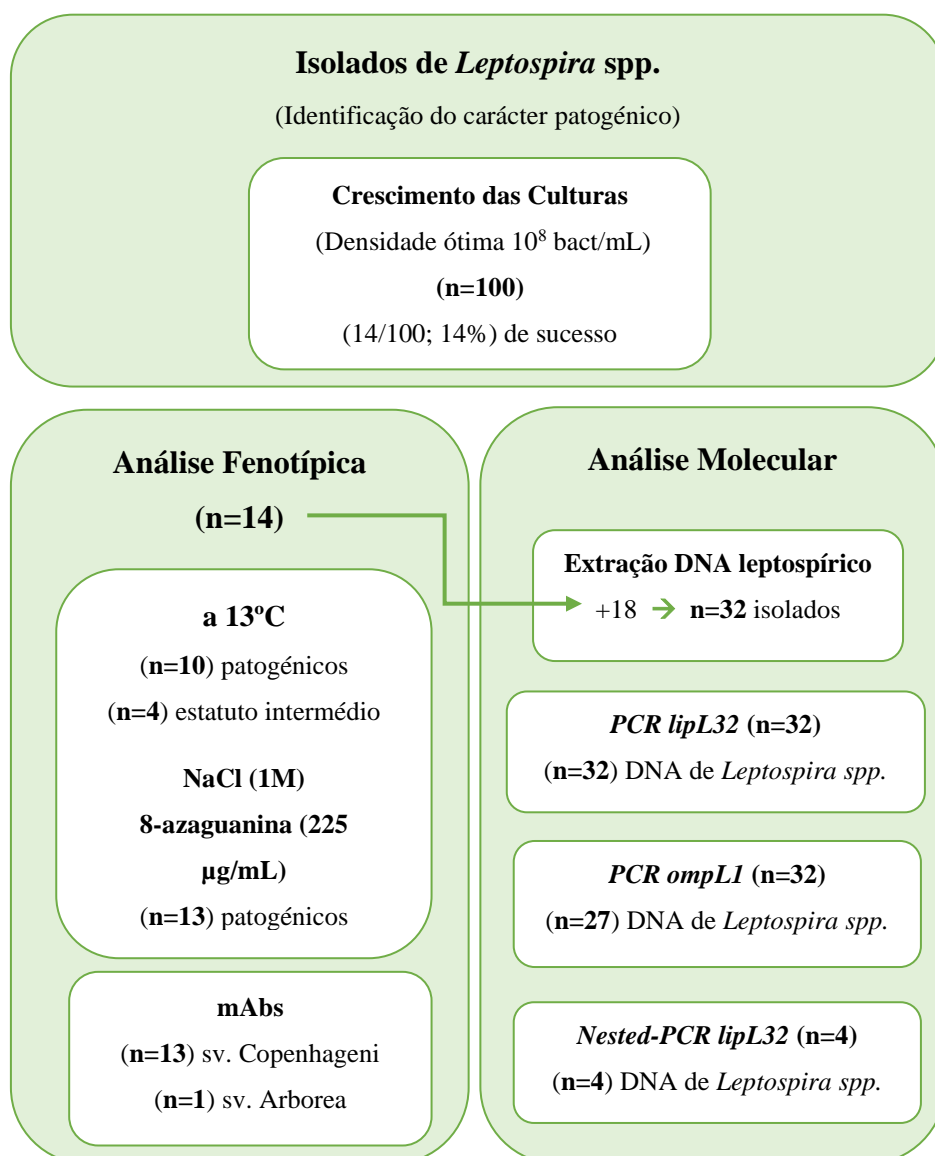


Figura 3.7. Resumo dos resultados obtidos pela abordagem fenotípica e molecular nos isolados de *Leptospira* spp., que integraram o estudo.

3.2 Amostras Humanas

3.2.1. Teste de Sensibilidade e de Especificidade

As amostras humanas (soro e urina) foram testadas também por PCR com os mesmos protocolos otimizados e descritos (**Parte I - 2.4.2**) nesta Dissertação. No entanto, houve a necessidade de testar a sensibilidade e a especificidade dos referidos protocolos,

já que as amostras humanas não contêm uma quantidade de DNA tão elevada como acontece com os isolados provenientes de culturas obtidas dos reservatórios (roedores). Assim, de acordo com o referido em (2.6.2) a determinação da sensibilidade teve por base diluições seriadas de base 10, que permitiram determinar a quantidade mais baixa de DNA detetável em cada uma das reações de PCR com os protocolos desenvolvidos e otimizados para os genes *ompL1* e *lipL32*, tendo esta sido de 10^6 bact/mL e 10^0 bact/mL, respetivamente.

No que respeita à especificidade, os protocolos otimizados foram testados com outras bactérias (espiroquetas) como *Treponema pallidum* e *Borrelia garinii*, espécies pertencentes à mesma Ordem (Spirochetales), tendo sido ainda incluído também um sorovar representante de leptospiros saprófitas que, por não possuir os referidos genes, não daria lugar a amplificação de DNA leptospírico (Fig. 3.8 e Fig. 3.9).

- **Gene *ompL1***

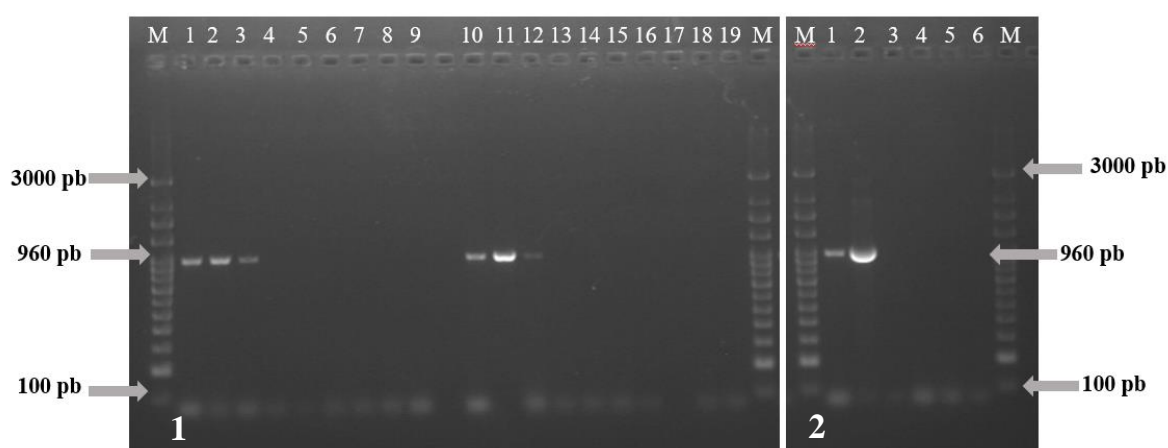


Figura 3.8. (1) Teste de sensibilidade para o protocolo que utilizou *primers* com base no gene *ompL1* (960 pb). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR de *L. borgpetersenii* (sv. Ballum); M - marcador molecular de 100 pb; 1-9 - diluições seriadas de base 10 onde 1= 10^8 bact/mL e 9= 10^0 bact/mL; 10-18 - réplica de 1-9; 19 - C⁻ da PCR. (2) Teste de especificidade para o mesmo protocolo. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR. M - marcador molecular de 100 pb; 1 - *L. borgpetersenii* (sv. Ballum); 2- *L. interrogans* (sv. Copenhageni); 3 - saprófita (sv. Patoc); 4 - *Borrelia garinii*; 5- *Treponema pallidum*; 6 - C⁻ da PCR.

• Gene *lipL32*

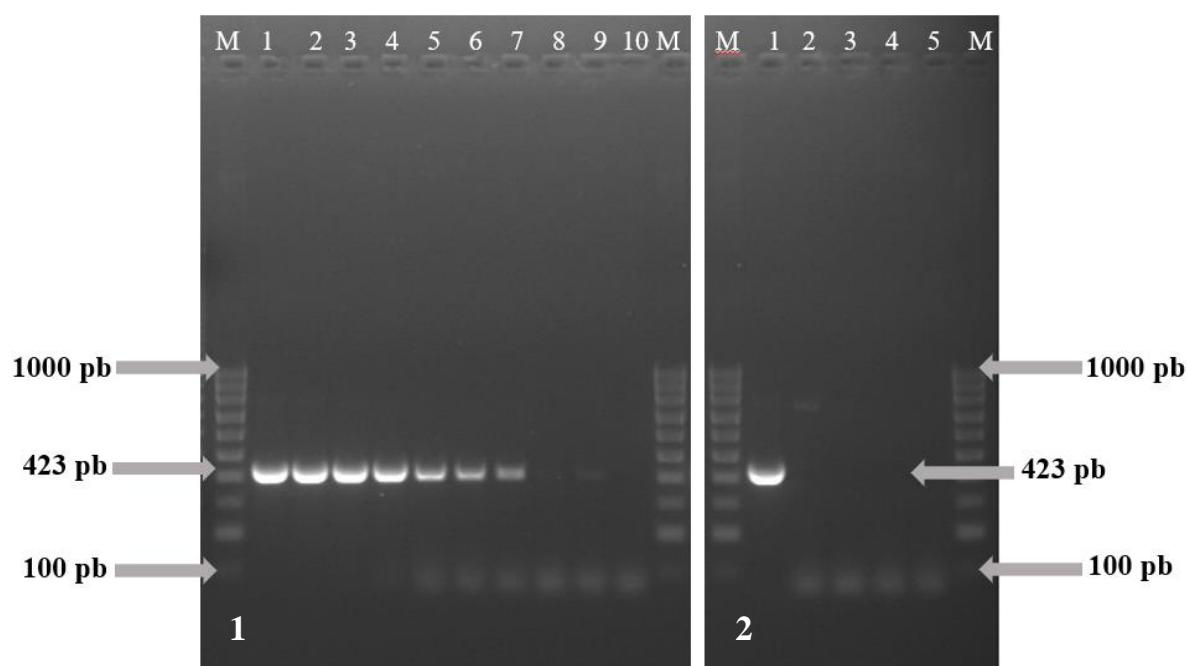


Figura 3.9. (1) - Teste de sensibilidade para o protocolo otimizado que utilizou *primers* com base no gene *lipL32* (423 pb). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR de *L. borgpetersenii* (sv. Ballum); M - marcador molecular de 100 pb; 1-9 - diluições seriadas de base 10, onde 1=10⁸bact/mL e 9= 1 bact/mL; 10 - C⁻ da PCR. (2) - Teste de especificidade para o mesmo protocolo. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR do *lipL32*. M - marcador molecular de 100 pb; 1 - *L. borgpetersenii* (sv. Ballum); 2 – saprófita (sv. Patoc) de *L. biflexa*; 3 - *Borrelia garinii*; 4 - *Treponema pallidum*; 5 - C⁻ da PCR.

3.2.2. DNA leptospírico com o gene *lipL32*

Não foi efetuado o protocolo para o gene *ompL1* para as amostras humanas devido à sua baixa sensibilidade, que demonstrou ser pouco eficaz na detecção de DNA leptospírico.

A amplificação de DNA leptospírico nas amostras de urina e de soro com o gene *lipL32*, a partir do protocolo otimizado de PCR convencional, permitiu obter uma banda de 423 pb, que se traduziu num resultado positivo, em (30⁺/99; 30,3%) e em (10⁺/28; 35,7%) das amostras, respetivamente (**Fig. 3.10**).

A partir da amplificação de DNA com o protocolo de *nested-PCR lipL32* (em uso na rotina do laboratório), foi possível obter um resultado positivo em (9⁺/11) amostras de urina e em (5⁺/5) amostras de soro, correspondendo a 81,8% e 100%, respetivamente.

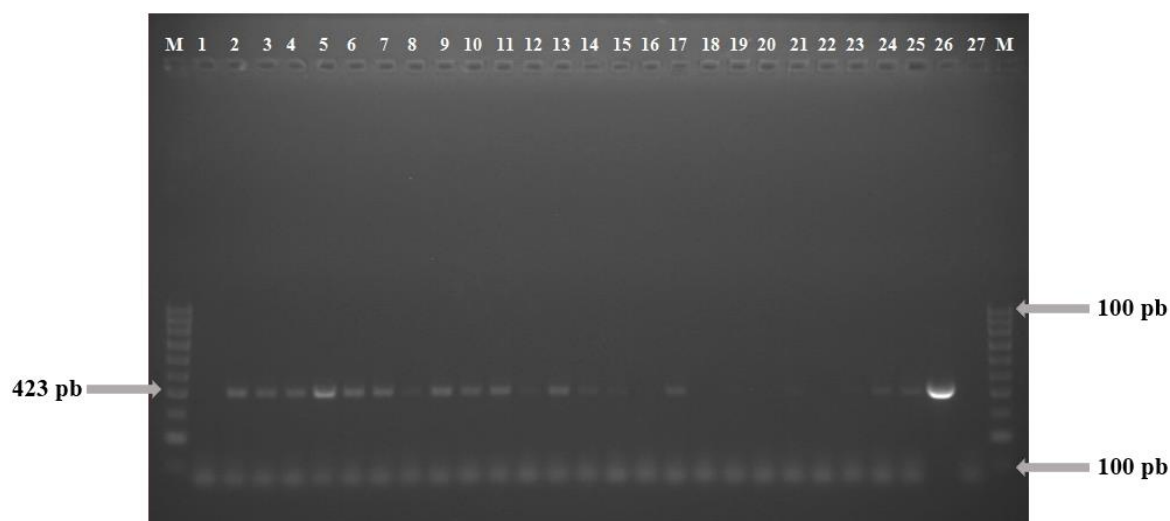


Figura 3.10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR amplificados para o alvo *lipL32* (423 pb), em amostras humanas (urina e soro). M - marcador molecular – 100 pb; 1-13 - amostras de soro; 14-25 - amostras de urina; 26 - C⁺ (estirpe M20, sorovar Copenhageni, sorogrupo Icterohaemorrhagiae); 27 - C⁻ da PCR.

O esquema resumo que está representado na (**Fig. 3.11**), serve para demonstrar sucintamente os resultados obtidos pelas abordagens moleculares tendo como alvo o gene *lipL32*. Com o protocolo otimizado no âmbito deste trabalho obteve-se amplificação de DNA de *Leptospira* spp., em (30⁺/99) das amostras de urina, e em (9⁺/28) das amostras de soro.

Com o protocolo da *nested-PCR* que amplifica um amplicão de 186 pb, as amostras de urina revelaram DNA leptospírico em (9⁺/11) e em todas as amostras de soro (5⁺/5).

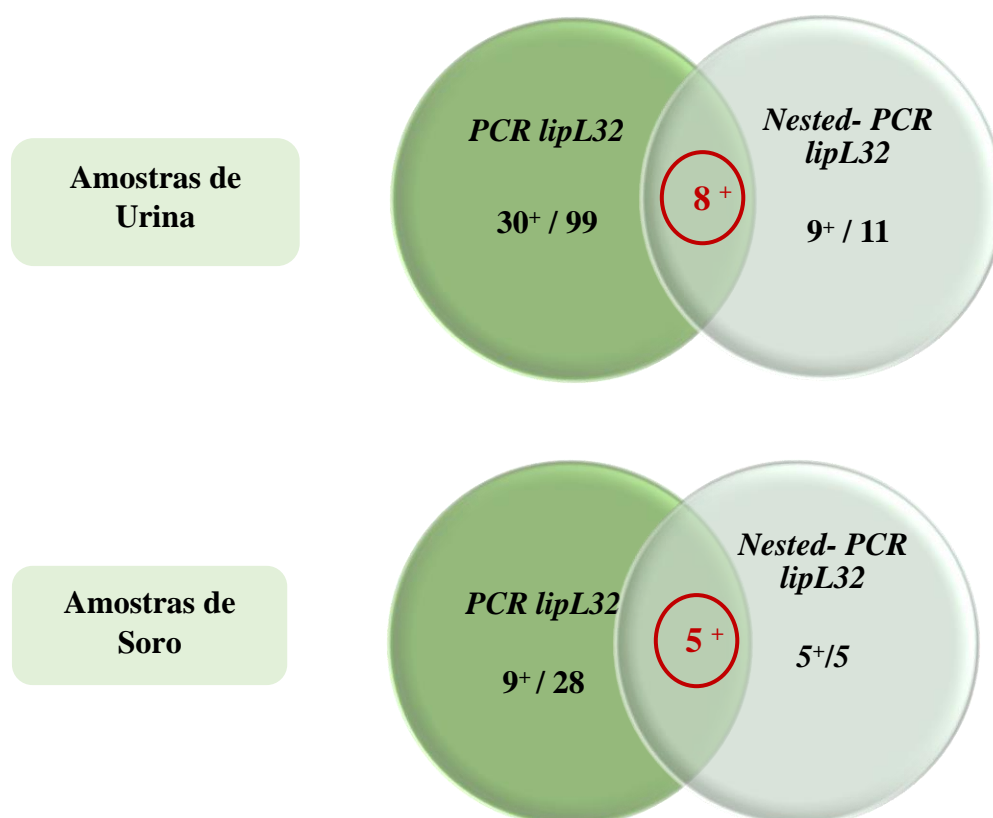


Figura 3.11. Esquema ilustrativo resumindo os resultados obtidos pelas diferentes abordagens moleculares (PCR convencional e *nested*-PCR) realizadas nas amostras humanas (urina e soro).

3.3. Sequenciação

A partir do DNA amplificado de algumas das amostras cujo alvo foi o gene *lipL32*, obtiveram-se as respectivas sequências nucleotídicas correspondentes a fragmentos (amplicões) desse mesmo gene. Com a referida informação foi possível confirmar, através do *BLASTn*, que (n=15/18; 83,3%) amostras eram efetivamente correspondentes com DNA de *Leptospira* spp. patogénicas, (**Tabela 3.3**), em (n=3) amostras, um isolado e duas amostras de urina, as sequências obtidas não mostraram similaridade com nenhuma sequência depositadas no *GenBank*.

Tabela 3.3. Resultados obtidos após pesquisa pelo *BLASTn*, das sequências em estudo relativas ao amplicão de DNA de 423 pb, do gene *lipL32*, das amostras humanas e também dos isolados de *Leptospira* spp..

	Isolados (n=5)	Amostras de Urina (n=9)	Amostras de Soro (n=4)
<i>Leptospira</i> spp. (patogénicas)	4	7	4
Não encontrou similaridade	1	2	-

3.4. Análise Filogenética

Partindo das sequências já devidamente editadas, e depois de efetuado o *BLASTn*, realizou-se uma árvore filogenética de modo a tentar atribuir uma genoespécie a cada isolado de *Leptospira* spp., bem como das amostras de urina e de soro.

No programa MEGA X, para a construção da árvore filogenética, foi escolhido o método *Maximum Likelihood* (Máxima Verosimilhança), pois é um método que tem em conta uma evolução não linear e devido ao facto do gene em causa, o gene *lipL32*, ser um gene altamente conservado. O modelo foi escolhido no próprio programa que indicou o Tamura 3-parâmetros como o melhor modelo para as amostras em causa.

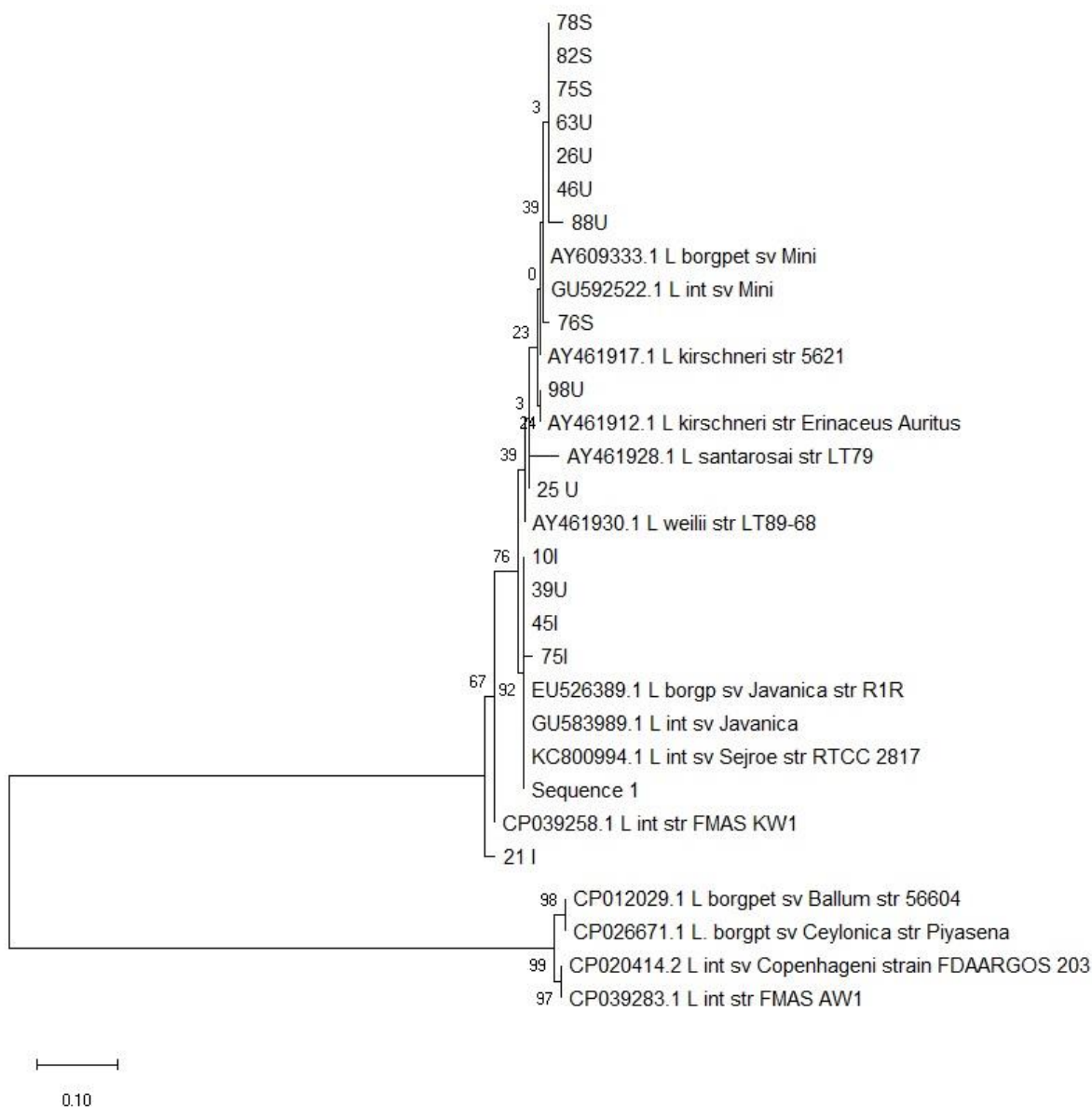


Figura 3.12. Árvore filogenética construída no programa MEGA X, utilizando o método da Máxima Verosimilhança e o modelo Tamura 3- parâmetros. As sequências foram obtidas pela amplificação de DNA a partir do gene *lipL32*, e foram utilizadas 15 amostras problema, juntamente com 14 sequências depositadas no *GenBank*. Os números nos ramos representam a percentagem de confiança (1000 *bootstraps*).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Como referido, a leptospirose afeta anualmente milhares de pessoas, em particular, nas zonas endémicas. É por isso necessário ter cada vez mais ferramentas para que se possa obter um diagnóstico mais rápido, sendo também de grande importância ter conhecimento epidemiológico das diversas áreas endémicas de leptospirose.

No nosso país, a leptospirose no Arquipélago dos Açores (região endémica), felizmente desde 2008, já não é causa de óbitos como acontecia antes da referida data. No entanto, continua ainda a mostrar taxas de morbilidade que não devem ser ignoradas, exigindo assim a continuação de estudos epidemiológicos que permitam ter conhecimento dos sorovares circulantes da região para uma melhor e mais rápida deteção da doença e melhor diagnóstico. Como também já foi mencionado, a maior parte dos protocolos moleculares atuais para a deteção da bactéria, isto é, do seu DNA, são morosos, exigem muitos reagentes e consequentemente uma maior manipulação das amostras que tem como resultado uma maior probabilidade de contaminação. Por todas estas razões é importante tentar desenvolver e otimizar novas metodologias que permitem tornar o diagnóstico laboratorial mais eficaz.

Assim, para a concretização do primeiro objetivo desta Dissertação, que consistia em caracterizar ao nível fenotípico, antigénico e molecular diferentes isolados de *Leptospira* spp., provenientes do Arquipélago dos Açores, foi necessário começar por relançar algumas culturas de *Leptospira* isoladas no âmbito do Projeto “*Epidemiologia e Controlo de Leptospirose nos Açores*” (Collares-Pereira *et al.*, 2007), ainda não estudadas. Por si só, esta primeira parte do trabalho já era desafiadora, pois cultivar leptospiros *in vitro* nunca é fácil, mesmo fornecendo às culturas todas as condições consideradas ideais para o seu crescimento. Na verdade, às já conhecidas dificuldades, houve ainda uma ou outra que decorreu do facto das referidas culturas estarem há alguns anos preservados a -80°C, tendo sido sujeitas durante este período a amplitudes térmicas decorrentes de falhas de energia.

Após vários meses de incubação em condições ótimas e de agitação manual diária, 14% das culturas atingiram uma densidade esperada para se poder proceder à sua identificação.

A identificação fenotípica revelou a uma temperatura de 13°C, 29% de culturas com carácter intermédio, enquanto que, as restantes apresentaram carácter patogénico. A esta temperatura leptospiros pertencentes ao complexo *L. interrogans* s.l. não crescem, isto porque, quando infetam os seus potenciais hospedeiros adaptam-se a valores térmicos superiores (geralmente nunca inferiores a 30°C), por outro lado, as leptospiros saprófitas, sendo bactérias ambientais, (solo, água e superfícies), encontram-se adaptadas a crescer a temperaturas mais baixas, geralmente até cerca de 10°C, conseguindo, no entanto, ótimos níveis de crescimento a 30°C, como demonstrado por Johnson e Harris (1967). As leptospiros consideradas intermédias apresentam um comportamento de transição entre as patogénicas e as saprófitas. Nos outros dois testes, referentes à adição de NaCl e de 8-azaguaninas, apenas 7% das culturas comportaram-se como intermédias, sendo as restantes patogénicas. No teste com NaCl, as bactérias patogénicas expostas a este composto ficam sujeitas a uma situação de stresse que compromete a integridade da membrana, alterando a sua morfologia e impossibilitando a sua sobrevivência neste tipo de meios (Trueba *et al.*, 2004). Com o composto 8-azaguanina, este ao ser introduzido no meio de cultura inibe a síntese da cadeia de DNA das espécies patogénicas de *Leptospira* (Johnson e Rogers, 1964), impedindo a sua replicação e estas acabam por morrer.

Com estes três testes, e partindo do menos para o mais sensível, observámos claramente uma propensão do carácter patogénico deste grupo de isolados. No primeiro teste, como foi explicado no (**Ponto 2.3.1**), as condições de temperatura não foram as ideais, traduzindo-se em resultados que não correspondem totalmente à realidade. No que respeita aos outros dois testes, o mesmo isolado apresentou um carácter intermédio em ambos, no entanto, este mesmo estatuto não foi confirmado nas restantes abordagens. Eram expectáveis culturas de *Leptospira* de carácter patogénico, pois estes isolados provêm de roedores que são o principal reservatório deste agente naquela área endémica (Witmer *et al.*, 2004; Collares-Pereira *et al.*, 2007). Estes três testes apenas revelaram a patogenicidade das culturas de *Leptospira* em estudo, no entanto, para identificá-las ao nível do sorogrupos/sorovar é sempre necessário recorrer a outras técnicas.

A identificação antigénica (mAbs) revelou que 93% das culturas estudadas pertenciam ao sorogrupos Icterohaemorrhagiae (sv. Copenhageni) e 7% ao sorogrupos Ballum (sv. Arborea), sendo estes, os dois sorogrupos com maior prevalência na referida região endémica como já comprovado em estudos anteriores (Collares-Pereira *et al.*,

2001; Gonçalves *et al.*, 2010). Todos os 14 isolados de *Leptospira* tinham em comum a sua proveniência, ilha Terceira, e o biótopo (peri-urbano), a principal diferença entre eles foi o reservatório de onde foram isolados. As 13 culturas do sv. Copenhageni correspondem a leptospiros que foram isoladas da espécie *Rattus norvegicus*, enquanto que, a única cultura caracterizada como sv. Arborea foi isolada de *Mus musculus*. Estes resultados mostram coerência com estudos anteriormente realizados, nesta região endémica (Vieira *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2010) e noutras regiões do globo (Higa e Fujinaka, 1976; Thiermann, 1977), e apesar dos reservatórios poderem alojar leptospiros de diferentes tipos de sorovares, existe uma associação entre determinados sorogrupos e algumas espécies de roedores. Os testes com mAbs têm uma sensibilidade maior que a dos testes anteriores pois permitem identificar de forma precisa o sorogrupo onde cada isolado se insere, tendo sido provado o carácter patogénico na totalidade dos isolados de *Leptospira* spp. em estudo, que cresceram com sucesso, situação que se antecipava e que foi comprovada por todas estas abordagens fenotípicas.

O segundo objetivo consistia em identificar dois alvos genéticos, *lipL32* e *ompL1*, em culturas de *Leptospira* spp. e amostras humanas (urina e soro) de utentes com suspeita de leptospirose. Após otimização dos protocolos, verificou-se que, no que respeita à especificidade, ambos os protocolos foram muito satisfatórios e dentro do exigido e, no que respeita à sensibilidade, o protocolo “ompL1” foi menos sensível (10^6 bact/mL) que o protocolo “lipL32” (10^0 bact/mL). Esta diferença é muito relevante quando se trata de amostras humanas, uma vez que estas não apresentam uma carga bacteriana tão elevada. Esta sensibilidade é francamente positiva, quando comparada com os outros dois protocolos de PCR convencional utilizados na rotina. Por um lado, existe um protocolo que utiliza *primers* baseados no gene *hap1* (*lipL32*), gene que codifica a proteína de superfície associada à hemólise, e que possui uma sensibilidade de apenas 10^5 bact/mL (Estanislau, 2014), por outro lado o protocolo *nested*-PCR, que utiliza também o gene *lipL32* como alvo, possui uma sensibilidade de 10 bact/mL (Jouglard *et al.*, 2006), mas implica duas etapas de amplificação, logo, está sujeito a uma maior probabilidade de contaminação, bem como envolve um maior gasto de tempo, de materiais e de reagentes. No caso do protocolo “lipL32”, adaptado em 2011 por Mayer-Scholl e colaboradores, a alteração mais significativa foi a temperatura a que ocorre o emparelhamento das cadeias de DNA, pois originalmente, em amostras provenientes de tecido renal de roedores, esta

aconteciam a 65°C e neste trabalho, depois de várias tentativas, percebeu-se que a 55°C era a temperatura mais apropriada para amostras que continham uma menor quantidade de DNA genómico, como é o caso de culturas pouco densas de *Leptospira* spp. ou de amostras humanas. Para o outro protocolo, o “ompL1”, inicialmente pensou-se que seria também uma excelente aposta devido aos resultados obtidos por Hernández-Rodríguez (2014), do qual provêm as sequências oligonucleotídicas, no entanto, nesse trabalho, foram utilizadas amostras de urina bovina, que contêm uma carga bacteriana muito superior às amostras humanas, traduzindo-se numa incapacidade de deteção em amostras de *Leptospira* spp. com menos carga bacteriana. A baixa sensibilidade pode estar também relacionada com o facto de estas apresentarem um conteúdo de G+C abaixo de 40%, o que não é aconselhável pela empresa que fornece os reagentes utilizados nesta metodologia.

A análise molecular aos isolados de *Leptospira*, comprovou os resultados das abordagens anteriores, mostrando que as culturas estudadas apresentavam DNA patogénico. No protocolo “lipL32” foi amplificado DNA leptospírico em 100% destas amostras, enquanto que, com o protocolo “ompL1” apenas em 84% dos mesmos. Esta diferença de resultados deve-se à menor sensibilidade do segundo protocolo.

Da totalidade das amostras de urina, cerca de 62% tiveram um resultado sobreponível ao resultado obtido anteriormente no LLBL, 10% não tinham sido avaliadas molecularmente e as restantes 28% não apresentaram um resultado concordante com o obtido na rotina. Uma das razões pela qual os resultados foram díspares, deve-se ao facto da menor sensibilidade do protocolo de PCR “hap1” com o qual foram avaliadas, comparativamente com este novo protocolo. Outra das razões possíveis, dever-se-á à integridade das amostras uma vez que algumas já se encontravam congeladas há alguns anos, ou o próprio DNA já tinha sido extraído também em anos anteriores.

No que diz respeito às amostras de soro, mais de metade não revelaram presença de DNA leptospírico. Este resultado era de algum modo esperado, já que havendo produção de anticorpos específicos as leptospiros desaparecem da circulação (Levett, 2001). Por outro lado, nas amostras onde foi detetada presença de DNA leptospírico, evidência que pode ser explicada pela eventualidade das amostras estarem numa fase precoce da resposta imune, quando em simultâneo se pode observar expressão de

anticorpos, mas esta não ser ainda suficiente para eliminar totalmente o agente da circulação sanguínea. Por outro lado, não se pode ignorar que a detecção de DNA do agente pode ser atribuível a leptospiros já lisadas.

Da análise da sequenciação foi possível caracterizar 83% das amostras como espécies patogénicas de *Leptospira*. Apesar da similaridade encontrada nas referidas amostras não foi possível identificar individualmente a espécie genómica à qual a mesma pertence, já que o segmento do gene *lipL32* por si só não é suficiente para distinguir e diferenciar as várias espécies, porque o mesmo é muito conservado em todas elas.

Da análise filogenética, foi possível confirmar todas as sequências como pertencentes ao género *Leptospira* e, mais uma vez, também a patogenicidade das mesmas. No entanto, tendo em conta os intervalos de confiança (valores de *bootstrap*) que os diversos ramos apresentaram, é impossível inserir com total certeza as amostras em estudo num determinado grupo/espécie. Estes resultados revelam que este gene, *lipL32*, e mais especificamente o segmento de 423 pb em estudo, não é o melhor marcador genético quando se realizam estudos filogenéticos. Isto pode dever-se a diversos fatores, como por exemplo, o tamanho do segmento ser demasiado pequeno ou como atrás referido, este gene ser transversal a todas as espécies patogénicas.

Na última década, os estudos filogenéticos e em particular os relacionados com o género *Leptospira*, têm vindo a ser desenvolvidos sobretudo utilizando sequências que têm como alvo genético 16S rRNA. De facto, as leptospiros possuem para este alvo dois genes (*rrs* e *rrl*), ambos presentes no mesmo cromossoma (C I), cujas sequências se encontram depositadas no *GenBank* (Morey, 2006; Cerqueira e Picardeau, 2009) relativas a estes mesmos genes. Para uma otimização de resultados admitimos que a utilização de um maior segmento do gene *lipL32*, ou até mesmo o gene completo poderá ser útil.

Neste trabalho, não foi realizada inferência estatística dado o tamanho dos universos das diversas amostragens utilizadas que não justificavam a referida análise.

Concluído o trabalho e após a discussão dos resultados obtidos, admite-se poder concluir que:

- Ficou demonstrada, através da detecção de DNA específico, a presença de leptospiros patogénicas nos reservatórios (roedores), havendo correspondência com os respetivos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum, sendo estes os mais prevalentes no Arquipélago açoriano, e responsáveis pelo maior número de casos de leptospirose na população local;
- Foi confirmado o tropismo dos diferentes sorogrupos para determinados reservatórios (ex. a espécie *Rattus norvegicus* está associada ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, enquanto que, a espécie *Mus musculus* tem maior afinidade para o sorogrupo Ballum);
- Ambos os protocolos de PCR, tanto com base no gene *ompL1* como em *lipL32*, apresentaram uma especificidade dentro do expectável, no entanto, verificou-se que a PCR tendo como alvo o gene *ompL1*, não possui tão boa sensibilidade quanto o anterior, apresentando o *lipL32* uma maior sensibilidade comparativamente à dos protocolos existentes e utilizados na rotina;
- Houve coerência entre os resultados obtidos com o novo protocolo e as abordagens de diagnóstico anteriormente realizadas, com a vantagem acrescida deste protocolo utilizar uma única reação;
- Ficou também demonstrado que a PCR com *lipL32* como alvo genético é muito eficaz para a análise de culturas de tecido renal de roedores, pelo que, pode ser utilizado em estudos de investigação epidemiológica, sobretudo, em áreas endémicas;
- Também ficou evidente que o segmento do gene *lipL32* em estudo, não é o melhor para estudos de filogenia, sendo para isso necessário recorrer a um outro marcador genético, como por exemplo, um gene universal, como o *rrs*.

Ao concluir-se este trabalho pode considerar-se que os objetivos propostos foram bem-sucedidos, já que, por um lado, foi possível aumentar o conhecimento epidemiológico de uma região endémica para leptospirose em Portugal, e por outro, foram desenvolvidas metodologias laboratoriais que podem apoiar não só a investigação, como também, o diagnóstico e assim, incrementar a eficiência do laboratório no diagnóstico da leptospirose na componente molecular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, B., Lo, M., Seemann, T. and Murray, G. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), pp.73-81.

Adler, B. and Peña-Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140, pp.287-296.

Ahmad, S. N., Shah, S. and Ahmad, F. M. H. (2005). Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51(3), pp.195-200.

Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Matthias, M., Diaz, M., Lovett, M., Levett, P., Gilman, R., Willig, M., Gotuzzo, E. and Vinetz, J. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), pp.757-771.

Carreira, T. M. (2009). Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da Leptospirose humana. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 65pp.

Cerqueira, G. and Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), pp.760-768.

Collares-Pereira, M. (1989). The epidemiology of leptospirosis in Portugal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(1), p.132.

Collares-Pereira, M., Mathias, M., Santos-Reis, M. G., Ramalhinho and P., Duarte-Rodrigues, P. (2001). Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *European Journal of Epidemiology*, 16, pp.1151-1157.

Collares-Pereira, M., et al. (2007). Epidemiology and controlo of Leptospirosis in Azores. Scientific Report (USA Scientific Cooperative Ageement N°58-401-3-F185, 2004-2007). Lisboa, 337pp.

Costa, F., Hagan, J., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M., Stein, C., Abela-Ridder, B. and Ko, A. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), p.e0003898.

Dupouey, J., Faucher, B., Edouard, S., Richet, H., Kodjo, A., Drancourt, M. and Davoust, B. (2014). Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2), pp.77-83.

Estanislau, E. (2014). Leptospirose humana na Província da Huíla: rastreio serológico e molecular de doentes assistidos no Hospital Central Dr. António Agostinho Neto, Lubango (Angola). Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 129pp

Esteves, L. M., Bulhões, S. M., Branco, C. C., Mota, F. M., Paiva, C., Cabral, R., Vieira, M. L. and Mota-Vieira, L. (2014). Human Leptospirosis: Seroreactivity and Genetic Susceptibility in the Population of São Miguel Island (Azores, Portugal). *PLoS ONE*, 9(9), p.e108534.

Garcia, J. (2011). Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular. Dissertação de Mestrado em Saúde Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 73pp.

Gonçalves, A. T. (2009). Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* spp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 114pp.

Gonçalves, A., Paiva, C., Melo-Mota, F., Vieira, M., Carreira, T., Nunes, M., Mota-Vieira, L., Ahmed, A., Harstkeerl, R., Hyde, K. and Collares-Pereira, M. (2010). First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, pp.e148-e153.

Haake, D. A. and Levett, P. (2015). Leptospirosis in Humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, pp.65-97.

Haake, D. A. and Zückert, W. R. (2016). The Leptospiral Outer Membrane. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, pp.187-221.

Higa, H. H. and Fujinaka, I. F. (1976). Prevalence of Rodent and Mongoose Leptospirosis on the Island of Oahu. *Public Health Reports*, 91(2), pp.171-177.

Hernández-Rodríguez, P., Arlen, G., Mónica, B. and Gladys, Q. (2014). Identification of *ompL1* and *lipL32* Genes to Diagnosis of Pathogenic *Leptospira* spp. Isolated from Cattle. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 04(05), pp.102-112.

Jouglaard, S., Simionatto, S., Seixas, F., Nassi, F. and Dellagostin, O. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(8), pp.747-752.

Johnson, R. C. and Rogers, P. (1964). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology*, 88(6), pp.1618-1623.

Johnson, R. C. and Harris, V. G. (1967). Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospires. *Journal of Bacteriology*, 94(1), pp.27-31.

Joshi, M. and Deshpande, J. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), pp.81-97.

- Ko, A., Goarant, C. and Picardeau, M.** (2009). Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), pp.736-747.
- Le Turnier, P. and Epelboin, L.** (2019). Mise au point sur la leptospirose. *La Revue de Médecine Interne*, 40(5), pp.306-312.
- Levett, P.** (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), pp.296-326.
- Levett, P.** (2004). Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(6), pp.435-448.
- Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Luge, E., Ulrich, R. and Nöckler, K.** (2011). Comparison of Two PCR Systems for the Rapid Detection of *Leptospira* spp. from Kidney Tissue. *Current Microbiology*, 62(4), pp.1104-1106.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. and Clark, D.** (2009). *Brock Biology of microorganisms*. 12th ed. San Francisco: Pearson International Edition, pp.324-325.
- Mohammed, H., Nozha, C., Hakim, K., Abdelaziz F. and Reikia, B.** (2011). *LEPTOSPIRA*: Morphology, Classification and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, 2:120. doi:10.4172/2155-9597.1000120
- Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W. and Levett, P.** (2006). Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), pp.3510-3516.
- Noguchi, H.** (1917). *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* in american wild rats and it's relation to the japonese and european strains: First Paper. *Journal of Experimental Medicine*, 25(5), pp.755-763.

Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), pp.1-9.

Picardeau, M., Bulach, D., Bouchier, C., Zuerner, R., Zidane, N., Wilson, P., Creno, S., Kuczek, E., Bommezzadri, S., Davis, J., McGrath, A., Johnson, M., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R., Rood, J., Lajus, A., Davies, J., Médigue, C. and Adler, B. (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE*, 3(2), p.e1607.

Raja, V. and Natarajaseenivasan, K. (2015). Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), pp.1-17.

Ren, S. X., Gang, F., Jiang, X. G., Zeng, R., Miao, Y. G., Xu, H., Zhang, Y. X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L. F., Jiang, H. Q., Jia, J., Tu, Y. F., Jiang, J. X., Gu, W. Y., Zhang, Y. I., Cai, Z., Sheng, H. H., Yin, H. F., Zhang, Y., Zhu, G. F., Wan, M., Huang, H. L., Qian, Z., Wang, S. Y., Wei, M., Yao, Z. H., Shen, Y., Qiang, B. Q., Xia, Q. C., Guo, X. K., Danchin, A., Saint Girons, I., Somerville, R. L., Wen, Y. M., Shi, M. H., Chen, Z., Xu, J. G., Zhao, G. P. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 422, pp. 888-892.

Santos, L., Adhikarla, H., Yan, X., Wang, Z., Fouts, D., Vinetz, J., Alcantara, L., Hartskeerl, R., Goris, M., Picardeau, M., Reis, M., Townsend, J., Zhao, H., Ko, A. and Wunder, E. (2018). Genomic Comparison Among Global Isolates of *L. interrogans* Serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae Identified Natural Genetic Variation Caused by an Indel. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8:193 doi:10.3389/fcimb.2018.00193.

Thiermann, A. (1977). Incidence of Leptospirosis in the Detroit Rat Population. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(5), pp.970-974.

Trivedi, T. H. and Kamath, S. A. (2010). Leptospirosis: Tropical to Subtropical India. Editorial. *Journal of the Association of Physicians of India*, 58, pp.351-352.

Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P. and Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology*, 7, pp.35-40.

Vedhagiri, K., Natarajaseenivasan, K., Chellapandi, P., Prabhakaran, S., Selvin, J., Sharma, S. and Vijayachari, P. (2009). Evolutionary Implication of Outer Membrane Lipoprotein-Encoding Genes ompL1, lipL32 and lipL41 of Pathogenic *Leptospira* Species. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(3), pp.96-106.

Veloso, I., Lopes, M., Salas, C. and Moreira, E. (2000). A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3), pp.339-343.

Vieira M.L. (2006). Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospiriose em áreas endémicas. Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 301pp.

Vieira, M. L., Gama-Simões, M. and Collares-Pereira, M. (2006). Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(5), pp.378-386.

Witmer, G., Martins, H. and Flor, L. (2004). Leptospirosis in the Azores: The Rodent Connection. *Environmental Sciences Commons*, pp.217-220.

World Health Organization. (2003). Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. 1st edition. *International Leptospirosis Society (ILS)*. 109 pp.

Zhylkibayev, A., Akishev, Z., Khasenov, B., Sarina, N., Ramankulov, Y., Mukanov, K. and Eskendirova, S. (2018). Obtaining and characterizations of a recombinant LipL32 protein for detection of leptospirosis. *Tropical Biomedicine*, 35(1), pp.280-287.

ANEXOS

ANEXO 1 –BASE DE DADOS DOS ISOLADOS DE *Leptospira* spp.

II ▾ Isolado ▾	Ilha ▾	Estudo ▾	Biotopo ▾	Espécie ▾	Sex ▾	Idac ▾	Passagen ▾	mAbs ▾	PCR LipL32 ▾	PCR ompL1 ▾	NestedPCR lipL32 ▾
10 H128	Terceira	Horizontal	Peri-urbano	Mus musculus	F	A	11	Arborea	Positivo	Positivo	/
11 H400	Terceira	Horizontal	Peri-urbano	Mus musculus	M	A	2	/	/	/	/
12 H346	Terceira	Horizontal	Peri-urbano	R. rattus	M	A	2	/	/	/	/
13 H365	Terceira	Horizontal	Peri-urbano	M. musculus	M	A	2	/	/	/	/
14 H249	Terceira	Horizontal	Peri-urbano	R. norvegicus	M	A	2	/	/	/	/
15 Pu643	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	12	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
16 Pu528	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	2	/	Positivo	Positivo	/
17 Pu571	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	2	/	Positivo	Positivo	/
18 Pu567	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	2	/	Positivo	Positivo	/
19 Pu524	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	2	/	Positivo	Positivo	/
20 Pu208	Terceira	Vertical	Peri-urbano	M. musculus	M	/	15	/	/	/	/
21 Pu636	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	18	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
22 Pu521	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	3	/	/	/	/
23 Pu586	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	15	Copenhagueni	Positivo	Positivo	Positivo
24 Pu639	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	4	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
25 Pu581	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	13	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
26 Pu580	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	15	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
27 Pu577	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	14	Copenhagueni	Positivo	Positivo	Positivo
28 Pu585	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	13	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
29 Pu573	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	3	/	/	/	/
30 Pu583	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	M	/	3	/	/	/	/
31 Pu641	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	16	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/
32 Pu635	Terceira	Vertical	Peri-urbano	R. norvegicus	F	/	13	Copenhagueni	Positivo	Positivo	/

Figura A3: Exemplo da Base de dados construída, no âmbito da presente Dissertação, referente às variáveis relativas aos reservatórios (roedores) dos quais foram obtidos os isolados de *Leptospira* em estudo.

ANEXO 2 - TESTES FENOTÍPICOS

Morfologia e Crescimento

Material:

- Câmara de fluxo laminar
- Bico de Bunsen
- Incubadora a 29°-30°C, com agitação orbital
- Culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/mL) das estirpes a identificar
- Meio de EMJH líquido - 4mL/tubo
- Tubos de vidro estéreis - 16 x 160 mm (Schott Duran®)
- 8-azaguanina (Sigma®)
- Solução de cloreto de sódio 1M
- Tubos *ependorf*® de 1,5 mL
- Pipetas Pasteur estéreis
- Centrifugadora

Procedimento:

Teste de crescimento a 13°C:

1. Preparar culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/mL) das estirpes de *Leptospira* a identificar;
2. Inocular 1 mL de cada cultura em 4 mL de meio EMJH líquido (Difco®);
3. Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 29°C;
4. Inocular 1 mL de cada cultura em 5 mL de meio EMJH líquido (Difco®);
5. Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 13°C;
6. Efetuar a observação microscópica (fundo escuro) de 5 em 5 dias durante 15 dias.

Teste de sensibilidade à 8-azaguanina (225µg/ml):

1. Preparar culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/mL) das estirpes a identificar;
2. Inocular 1 mL de cada cultura em 4 mL de meio EMJH líquido (Difco®);
3. Inocular 1 mL de cada cultura em 4 mL de meio EMJH líquido (Difco®) com 8-azaguanina (225µg/ml);

4. Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 29° C;
5. Efetuar a observação microscópica (fundo escuro) de 5 em 5 dias durante 15 dias.

Teste do cloreto de sódio 1M:

1. Centrifugar 1 ml de uma cultura jovem (4 a 10 dias) e densa (10^8 bactérias/mL) a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 4 minutos à temperatura ambiente;
2. Descartar o sobrenadante;
3. Ressuspender em igual volume de NaCl 1M;
4. Aguardar 2-3 horas à temperatura ambiente;
5. Observar em microscópio de fundo escuro.

Referência Bibliográfica:

Protocolo *adaptado* de Gonçalves, 2009.

ANEXO 3 – TESTES COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Material Necessário:

- Anticorpos Monoclonais (mAbs)
- Antígeno vivos – culturas de 4 a 13 dias de *Leptospira* spp., em meio líquido EMJH com uma densidade ótima (aproximadamente 10^8 células/mL).
- Solução tampão PBS (pH 7,2 - 7,4)
- Tubos *ependorf* 1,5mL
- Placa de titulação de fundo plano
- Micropipeta de 5 a 50 μ L e micropipeta multicanal
- Pipetas de Pasteur calibradas e esterilizadas (cada gota=35 μ L)
- Bico de Busen
- Vortex
- Estufa de incubação a 37° C
- Microscópio de fundo escuro com objetiva de longa distância focal (x20) para leitura direta das microplacas.

Procedimento:

- 1) Diluir de 1:20 o soro híper-imune em solução tampão MAT, num *ependorf*.
- 2) Marcar a placa de ELISA, conforme a figura, onde em cada coluna teremos os diferentes antígenos nas diluições seriadas. Na linha H apenas se coloca tampão e antígeno, 35 μ L de ambos, e esta servirá de testemunho.
- 3) Adicionar a todos os poços da placa de ELISA de 35 μ L de solução tampão MAT, perfazendo uma diluição de 1:40.
- 4) Adicionar 35 μ L do anticorpo monoclonal a testar na primeira linha da placa
- 5) Efetuar diluições seriadas com o mesmo volume utilizado de soro, descartando o volume da última diluição.
- 6) Adicionar uma gota (\pm 35 μ L), usando uma pipeta Pasteur a todos os poços com as diferentes diluições e adicionar também no poço que corresponde à testemunha.
- 7) Incubar na estufa 37° C, durante 2 horas.
- 8) Observar no microscópio de fundo escuro.

		Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:80	A												
1:160	B												
1:320	C												
1:640	D												
1:1280	E												
1:2560	F												
1:5120	G												
Testemunha	H												

Figura A1. Esquema ilustrativo da marcação da placa de titulação de fundo plano utilizada no estudo com anticorpos monoclonais aos isolados de *Leptospira* spp..

Referência Bibliográfica:

Protocolo *adaptado* de Gonçalves, 2009.

ANEXO 4 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO DOS ISOLADOS***Citogene®Cell and Tissue*****Purificação de DNA a partir de 3-5 milhões de células**

- 1) Adicionar 500 µL de solução ou meio de cultura a um tubo de 1,5 mL.
- 2) Centrifugar a 14.500 rpm (*Scanspeed 1730MR*, Frilabo) durante 1min. para fazer um *pellet* de células. Remover o sobrenadante deixando 20-40 µL de líquido residual.
- 3) Ressuspender as células no vórtex, com agitação vigorosa.
- 4) Adicionar 600 µL de solução *Cell Lysis* à suspensão celular e ressuspender para lisar as células (em alternativa, agitar no vórtex em alta velocidade). Geralmente não é necessária uma incubação. Contudo, se após a agitação forem visíveis aglomerados, incubar a 37°C até que a solução fique homogênea.

- Obtenção do Lisado -

Tratamento com RNase

- 5) Adicionar 3 µL de solução de RNase A ao lisado celular.
- 6) Misturar a amostra, invertendo o tubo 25x e incubando a 37°C durante 15-60 min.
- 7) Arrefecer a amostra à temperatura ambiente.
- 8) Adicionar 200 µL de solução *Protein Precipitation* ao lisado celular.
- 9) Agitar no vórtex a velocidade elevada durante 20 seg. para misturar uniformemente a solução *Protein Precipitation* com o lisado celular.
- 10) Centrifugar durante 3 min. a 14.500 rpm, para formar um *pellet* compacto de proteínas. Se o *pellet* não for visível, repetir o passo 9, seguido por incubação em gelo durante 5 min. A seguir repetir o passo 10.
- 11) Decantar o sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol a 100%, tendo o cuidado de deixar ficar para trás o *pellet* de proteínas.
- 12) Misturar a amostra invertendo cuidadosamente 50x.
- 13) Centrifugar 2 min. a 14.500 rpm. O DNA ficará visível sob a forma de um pequeno *pellet* branco.
- 14) Deitar fora o sobrenadante e escorrer com cuidado o tubo para papel absorvente. Adicionar 600 µL de etanol a 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA.

- 15) Centrifugar 2 min. a 14.500 rpm. Deitar fora o etanol com cuidado, pois o *pellet* pode estar solto.
- 16) Inverter e escorrer o tubo em papel absorvente e deixar secar ao ar durante 1 hora.
- 17) Adicionar 50 µL de *DNA Hydration*.
- 18) Incubar as amostras durante a noite à temperatura ambiente.

Obtenção do DNA genómico.

Para armazenar durante longos períodos, guardar a **-20°C** ou a **-80°C**.

Referência Bibliográfica:

De acordo com as instruções do fabricante.

ANEXO 5 – *Nested-PCR lipL32*

Protocolo de Amplificação de DNA de *Leptospira* – *Nested-PCR lipL32 (183 pb)*

Primer F: 5'- CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT - 3' (*forward*)

Primer R: 5' - CTCACCGATTTCGCCTGTTGGG - 3' (*reverse*)

Primer F1: 5' - CTCCCATTTTCAGCGATTACGG - 3' (*forward*)

Primer R1: 5' - TTCTGAGCGAGGACACAATCCC - 3' (*reverse*)

Tabela A1. Descrição das condições da PCR relativamente à amplificação do DNA, dos isolados de *Leptospira* spp. e das amostras humanas, utilizando o *nested-PCR*, tendo como alvo o gene *lipL32*.

Componentes da 1ª mix	Volume final 25 µL	Condições da Reação	T (°C)	Duração (min.)	Ciclos
H2O autoclavada	10,15	Desnaturação inicial	94	5	
Buffer (10x) (Bioline®)	2,5				
MgCl2 (50 mM) (Bioline®)	1,25	Desnaturação	94	1	35
dNTP'S (100 mM) (Bioline®)	0,50	Emparelhamento	55	1	
Primer lipL32F (100µM)	0,20	Extensão	72	1	
Primer lipL32R (100µM)	0,20	Extensão Final	72	7	
Taq (5U/µL) (Bioline®)	0,20				
Template (molde)	10,00				

NOTA: A 2ª etapa da PCR mantém todas as condições da 1ª.

Electroforese em gel de agarose:

- 125 volts, durante 35 min
- gel de agarose 2%
- 6 μ L de marcador de peso molecular 100 - 1000 pb
- Produto de DNA amplificado 6 μ L + 2 μ L *loading buffer*
- *Greensafe* 2 μ L

Referência Bibliográfica:

Jouglard *et al.*, 2006.

ANEXO 6 – BASE DE DADOS DAS AMOSTRAS HUMANAS

Id	Tipo de Amos	Soro	Gén	Idade	Hospital	Localiz	Obs Escu	ResultdMAT	ResClnPrimer	ResClnPCR	Urina PC	Soro PCR	PCR-nested
2	Urina	/	M	78	H.Esp Santo	Évora	-	/	hap1	-	-	/	/
3	Urina	/	M	--	D.Estefânia	Lisboa	-	/	hap1	-	-	/	/
4	Urina	/	M	5	D.Estefânia	Lisboa	-	/	lipL32	-	+	/	+(U)
5	Urina	/	F	17	D.Estefânia	Lisboa	NC	/	lipL32	-	-	/	/
6	Urina	/	F	12	D.Estefânia	Lisboa	-	/	lipL32	-	-	/	/
7	Urina	soro	M	24	H.Esp Santo	Évora	-	Patoc	lipL32	-	-	-	/
8	Urina	/	M	64	H.Esp Santo	Évora	-	/	lipL32	-	-	/	/
9	Urina	soro	M	77	H.Esp Santo	Évora	NC	Patoc, RGA, M20	lipL32	-	-	-	/
10	Urina	/	F	15	D.Estefânia	Lisboa	+/-	/	lipL32	-	-	/	/
11	Urina	/	F	9	D.Estefânia	Lisboa	-	/	lipL32	-	+	/	+(U)
12	Urina	/	M	65	H.Esp Santo	Évora	+/-	/	lipL32	-	+	/	+(U)
13	Urina	/	M	63	H.Esp Santo	Évora	+	RGA, M20, Pom	lipL32	-	-	/	/
14	Urina	/	F	44	H.Esp Santo	Évora	NC	RGA, M20	lipL32	-	-	/	/
15	Urina	/	M	61	H.Esp Santo	Lisboa	+	/	lipL32	+	-	/	/
16	Urina	/	F	13	H.L.Centr	Lisboa	+	/	lipL32	+	-	/	/
17	Urina	/	M	45	H.Esp Santo	Évora	+	/	/	/	-	/	+(U)
18	Urina	/	F	7	D.Estefânia	Lisboa	-	/	/	/	-	/	/
19	/	soro	M	/	H.Santo Esp	Ilha Terc	N/C	Patoc, Bal, Pom	/	/	/	-	/
20	Urina	Soro	M	65	H.Esp Santo	Évora	+/-	RGA, Poi, Aut ..	/	/	-	-	/
21	Urina	/	M	70	H.Esp Santo	Évora	+/-	/	/	-	-	/	/
22	Urina	/	F	8	H.Esp Santo	Évora	+	/	lipL32	-	-	/	/
23	Urina	/	M	--	D.Estefânia	Lisboa	+	/	lipL32	-	-	/	/
24	Urina	/	M	14	D.Estefânia	Lisboa	+	/	lipL32	+	-	/	/
25	Urina	/	M	14	D.Estefânia	Lisboa	/	/	lipL32	+	+	/	/
26	Urina	/	M	59	H.Esp Santo	Lisboa	NC	/	lipL32	-	+	/	/
27	Urina	/	F	3	D.Estefânia	Lisboa	-	/	lipL32	-	-	/	/

Figura A4: Exemplo da Base de dados, construída no âmbito da presente Dissertação, referente às amostras humanas (urina e soro), utilizadas para a realização do estudo.

ANEXO 7 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO DAS AMOSTRAS HUMANAS *Citogene®Cell and Tissue*

Purificação de DNA a partir de 100µL de fluídos corporais

- 1) Adicionar 100 µL de fluido a um tubo estéril contendo 500 µL de *Cell Lysis*. Ressuspender várias vezes com a pipeta para lisar as células.
- 2) Adicionar 3 µL de proteinase K (200 mg/mL) e incubar o lisado a 55°C durante 1h30.
- 3) Adicionar 3 µL de solução de RNase A ao lisado celular.
- 4) Misturar a amostra, invertendo o tubo 25 vezes e incubar a 37° C durante 30 minutos.
- 5) Arrefecer a amostra à temperatura ambiente, aproximadamente 15 min.
- 6) Adicionar 200 µL de solução *Protein Precipitation* ao lisado.
- 7) Agitar no vórtex a velocidade elevada durante 20 seg. para misturar uniformemente a solução *Protein Precipitation* com o lisado celular.
- 8) Colocar a amostra em gelo durante 5-15 min..
- 9) Centrifugar durante 5 min. a 14.500 rpm, para formar um *pellet* castanho de proteínas.
- 10) Decantar o sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol a 100% tendo o cuidado de deixar ficar para trás o *pellet* castanho de proteínas. Caso a amostra contenha um elevado teor de lípidos ou outras substâncias que se acumulem na superfície do líquido, transferir o sobrenadante usando uma pipeta, por forma a que as mesmas não sejam transferidas.
- 11) Misturar a amostra invertendo cuidadosamente 50 vezes e manter o tubo à temperatura ambiente pelo menos 5 min.
- 12) Centrifugar 5 min. a 14.500 rpm; dependendo do rendimento o DNA poderá ou não ficar visível, sob a forma de um pequeno *pellet* branco.
- 13) Eliminar o sobrenadante e escorrer com cuidado o líquido restante do tubo para papel absorvente. Adicionar 600 µL de etanol a 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA.
- 14) Centrifugar 1 min a 14.500 rpm. Eliminar o etanol com cuidado, pois o *pellet* pode estar solto e perder-se.

- 15) Inverter e escorrer o tubo em papel absorvente e deixar secar ao ar até este estar completamente seco.
- 16) Adicionar 20 μL de *DNA Hydration* e levar ao vórtex 5seg, para obter uma concentração aproximada de 200 $\mu\text{g/mL}$, para um rendimento aproximado de 20 μg de DNA.
- 17) Incubar as amostras durante a noite à temperatura ambiente.

Referência Bibliográfica:

De acordo com as instruções do fabricante, incluídas no *kit*.